



# **Påverkan av probiotika på kariesbildande bakterier *in vivo***

**Carl Åkesson**

---

**Uppsala BioCenter  
Institutionen för mikrobiologi  
Fakulteten för naturresurser och  
lantbruksvetenskap  
Sveriges lantbruksuniversitet**

**Uppsala**

**Självständigt arbete 2010:13**

**ISSN 1101-8151**

**ISRN SLU-MIKRO-EX-10/13-SE**

---





# Påverkan av probiotika på kariesbildande bakterier *in vivo*

Carl Åkesson

Handledare: Stefan Roos

Examinator: Hans Jonsson

**Nyckelord:** *Streptococcus mutans, Lactobacillus reuteri, probiotika, karies, T-RFLP*

**EX0427 Självtändigt arbete i livsmedelsvetenskap – magisterarbete  
30 hp, nivå A1E, inom agronomprogrammet - livsmedelsinriktning**

---

Uppsala BioCenter  
Institutionen för mikrobiologi  
Fakulteten för naturresurser och  
lantbruksvetenskap  
Sveriges lantbruksuniversitet

Självtändigt arbete 2010:13

Uppsala

ISSN 1101-8151

ISRN SLU-MIKRO-EX-10/13-SE

---



## **Förord**

Att arbeta med sitt examensarbete har kanske för många varit jobbigt, så har det inte varit för mig. Jag har haft otroligt kul och haft den bästa institutionen man kan ha.

Först skulle jag vilja tacka min handledare, Stefan Roos, som alltid ställde upp, oavsett om han själv hade mycket att göra. Han tog sig tid och gjorde mitt examensarbete mycket roligt att arbeta med. Detta gäller givetvis även Hans Jonsson, som hjälpte mig när Stefan inte var tillgänglig.

Therese Rice, Klara Båth och Cecilia Berglund har varit till stor hjälp när man har haft frågor och behövt hjälp på labbet.

Uppsala Mars 2010

Carl Åkesson



## Sammanfattning

Karies var förr ett mycket vanligt problem men med tiden har människor blivit bättre på att ta hand om sina tänder. Dock finns det fortfarande många som har problem. Detta problem beror på att mikroorganismer, i synnerlighet olika streptokocker och laktobaciller, producerar syror som luckrar upp emaljen på tänderna. Dessa bakterier finns på olika ställen i munnen och i saliven. Förutom att det blir besvär i form av ilningar och obehag kan det vid stora problem vara tvunget att ta bort den skadade tanden eller genomföra en tandfyllning.

Målet och syftet med studien var att se hur intag av probiotiska tabletter som innehåller *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 och *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 påverkar nivåerna av orala *Streptococcus mutans* och laktobaciller under en treveckors period. Dessutom undersöktes huruvida probiotika stannar kvar i den orala floran en vecka efter sista tabletten tas.

*Lactobacillus reuteri* (Lr), är en så kallad probiotisk "god bakterie" som normalt används som kosttillskott eller som tillsats till så kallade funktionella livsmedel. Flera olika företag har produkter med probiotiska bakterier som har olika egenskaper. Beroende på egenskapen hos bakterien kan den användas för att eventuellt lindra eller minska olika besvär i kroppen.

Effekten av probiotika på kariesbildande bakterier var god och av resultaten att döma sågs en tydlig minskning av *S. mutans* redan efter första veckan för gruppen som fick probiotika. Detta kan jämföras med personerna som fick placebo vilka låg på en relativt stabil nivå av *S. mutans* under hela studien. En signifikant skillnad fanns mellan probiotikagruppen vecka noll till vecka två,  $p=0,02$ . Det som är intressant är att vissa av deltagarna hade kvar båda de probiotiska laktobacillerna efter att studieprodukten var slut, medan andra bara hade *L. reuteri* ATCC PTA 5289 kvar. En av deltagarna hade till och med ökat nivån av *L. reuteri* ATCC PTA 5289 under vecka tre.

T-RFLP är en utmärkt metod för att studera sammansättningen i ett bakteriesamhälle. I denna studie analyserades endast prover från tre personer tagna vid två tidpunkter vilket är i minsta laget och för att få ett mer pålitligt resultat bör fler prover analyseras framöver. Resultatet från analysen av två prover från personer behandlade med probiotika och ett med placebo antydde i alla fall att sammansättningen var mycket stabil under de två veckorna. Dessutom var sammansättningen hos de tre personerna överraskande lika då cirka 50 procent av TRFerna fanns hos alla deltagare. *L. reuteri* ändrade inte bakteriesammansättningen men det är möjligt att analys av prover från fler individer och tagna under en längre tid kan ändra denna slutsats.

Som slutsats kan sägas att studien har fungerat bra och att använda plattor vid en sådan här studie för att odla *S. mutans* har inte gjorts förut då andra produkter har används istället. Detta har gjort att studien har fått bättre kvantifiering av resultaten än vad tidigare studier har fått. Det gjordes även ett helt nytt substrat för odling av *L. reuteri* ATCC PTA 5289 som inte har funnits tidigare, detta möjliggör att substratet kommer att användas i framtida studier. Att *L. reuteri* har detekterats en vecka efter att studieprodukten var slut är ett resultat som aldrig visats tidigare, vilket skulle vara värt att studera vidare på.





## Abstract

Cavities used to be a very common problem but over time humans have learned to take care of their teeth. However, there are still many who have problems. This problem is due to microorganisms and in particular the various streptococci and lactobacilli producing acids which loosens up the enamel on teeth. These bacteria can be found at various places in the mouth and saliva. Besides being a discomfort it can be a major problems and the damaged tooth needs to be removed or make a dental filling.

The aim of the study was to see how intake of probiotic tablets containing *Lactobacillus reuteri* PTA ATCC 5289 and *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 affects the levels of oral *Streptococcus mutans* and lactobacilli over a three-week period. Furthermore to see how long probiotics remains in the oral flora one week after the last tablet is taken.

*Lactobacillus reuteri* (LR), is a "probiotic" good bacterium that normally is used as supplement or added to so-called functional foods. Several companies have products with probiotic bacteria with different characteristics. Depending on the ability of the bacterium, it can be used to possibly reduce or alleviate various disorders in the body.

The effects of probiotics on caries-forming bacteria were good and judging by the results, there was a marked reduction of *S. mutans* after the first week. This can be compared with the persons who received placebo which had relatively stable levels of *S. mutans* during the entire study. A significant decrease of *S. mutans* in the probiotic group was seen between week zero and two,  $p = 0.02$ . What is interesting is that some of the participants had both probiotic lactobacilli left when the last study product was taken, while others had only *L. reuteri* ATCC PTA 5289. One of the participants had even an increased level of *L. reuteri* ATCC PTA 5289 in week three.

T-RFLP is a good method for studying the distribution of a bacterial community. In this study, only three people were included and to obtain more reliable results more samples should be analysed in the future. The result from analysis of three participants, two probiotics and one placebo, indicated that the microbial composition was surprisingly stable over the two-week period. Approximately 50 percent of TRFs were in common between the participants. Also, *L. reuteri* does not change the dominant bacterial composition but it cannot be excluded that analysis of more samples over a longer period will change this conclusion.

As conclusion it can be said that the study has worked well and to use the plates in this kind of study to grow *S. mutans* has not been done before when other products have been used instead. This allowed better quantification of the results than previous studies have received. There was also an entirely new medium for the cultivation of *L. reuteri* ATCC PTA 5289 which has not existed before, this allow the substrate to be used in future studies. The fact that *L. reuteri* has been detected a week after the last intake of product is a result that has never been shown before, which would be worth studying further on.



## Innehåll

1. Inledning.....	11
2. Mål .....	11
3. Studiens design.....	11
4. Karieshistorik .....	12
5. <i>Streptococcus mutans</i> .....	13
5.1 Etiologi .....	15
5.2 Sackaros i dieten.....	16
5.3 Får barn och ungdomar lättare hål i sina tänder?.....	17
6. Fluortanten .....	17
7. Probiotika .....	17
7.1 Probiotikans historia .....	18
8. T-RFLP.....	19
9. Tidigare studier av probiotika mot karies .....	20
9.1 <i>Lactobacillus reuteri</i> i tabletter och sugrör .....	20
9.2 <i>Lactobacillus reuteri</i> i tuggummi .....	21
9.3 <i>Lactobacillus reuteri</i> i barnnappar .....	23
9.4 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG i mjölk.....	24
10. Material och metod.....	25
10.1 Media optimering .....	25
10.1.1 <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 5289.....	25
10.1.3 <i>Streptococcus mutans</i> .....	26
11. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) .....	27
12. Resultat.....	29
12.1 Optimering av odlingsmedium .....	29
12.2 Analys av laktobaciller .....	30
12.2.1 Analys av <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 5289.....	31
12.2.2 Analys av <i>L. reuteri</i> DSM 17938.....	31
12.3 Analys av <i>S. mutans</i> .....	32
12.3.1 Konfirmering av <i>Streptococcus mutans</i> .....	34
12.4 T-RFLP.....	35
13. Diskussion .....	37
14. Slutsats .....	39

15. Referenser.....	40
14.1 Litterära källor .....	40
15.2 Internetkällor .....	41
15.3 Personliga meddelanden .....	42
16. Bilagor .....	43
16. 1 Primers.....	43
16. 2 Substratrecept .....	43
16.3 Formler och statistik .....	43

## 1. Inledning

Många i världen har problem med sin tandhälsa vilket dels beror på sackaros som många bakterier metaboliserar, men det kan även bero på bristande hygien eller på olika typer av hormonförändringar som sker i kroppen. Stress är ett exempel på något som kan göra munnen torr. När munnen blir torr får bakterierna i munnen lättare att bilda plack då de inte sköljs bort av saliven. För att hjälpa människor som har problem krävs nytänkande och därför har företag utvecklat probiotika för att underlätta människors problem med tandhälsan. Probiotika finns i olika produkter som exempelvis fil, yoghurt och juicer men finns också som rena produkter i form av tabletter. Denna studie har undersökt hur probiotika påverkar kariesbildande bakterier hos slumpmässigt valda personer.

## 2. Mål

Målet med studien var att se hur intag av probiotiska tabletter (ca  $10^8$  CFU/tablett) som innehåller *Lactobacillus reuteri* ATC PTA 5289 och *L. reuteri* DSM 17938 påverkar nivåerna av orala *Streptococcus mutans* och laktobaciller under en treveckorsperiod. Vidare undersöktes huruvida stammarna finns kvar i munnen en vecka efter att sista tabletten tagits. Dessutom skulle effekter på totala mikrobiotan studeras.

## 3. Studiens design

Studien var randomiserad, dubbelblind och placebokontrollerad med 14 frivilliga deltagare som var i åldern 18-65 år (fem män och nio kvinnor). Deltagarna fick information om att de inte fått använda antibiotika eller probiotika tre veckor innan studien startade eller under studiens gång. De skulle fortsätta med en normal munhygien och att borsta tänderna två gånger per dag. Från randomiseringslistan fick deltagarna varsin burk med placebo eller aktiv produkt och dessa skulle tas två gånger per dag, en morgon och en kväll, under tre veckor.

Salivprovtagningen gjordes med en veckas mellanrum och för att stimulera salivproduktionen tuggade personerna på paraffinkapslar (Ivoclar Vivadent). Varje deltagare lämnade fem milliliter saliv varje vecka under tre veckors tid, totalt 56 prover från 14 deltagare.

#### 4. Karieshistorik

Karies eller tandröta har många namn och har varit och är än idag ett stort problem i vissa länder där tandkräm och tandborste inte finns eller är för dyrt att köpa (www, ADA, 2010). Begreppet karies började användas redan år 5000 före Kristus. I Irak, dåvarande södra Mesopotamien, har texter påträffats där tandmaskar ansågs ha orsakat tandbesvären.

Tandläkare fanns i Egypten redan under perioden "Old Kingdom" (3000 f.kr.) och den förste som fick bära titeln var Hesy-Re (www, egyptologyonline, 2010).

Samtidigt som den förste titulerade tandläkaren kom så gjordes också den första tandborsten, den gjordes av babylonier genom att bränna änden av en kvist (www, Colgate World of Care, 2010 och www, About, 2010). Kineserna tros ha uppfunnit den första tandborsten vid 15:e århundradet, tandborsten kan liknas med den moderna tandborste som används idag. Den kinesiska tandborsten bestod av borsthårstrån från grisnacke som sattes fast på ett ben eller en bambupinne. Idén var revolutionerande och när sedan borsten kom till Europa så ändrades formen och designen och de började istället använda hårstrå från häst som ansågs vara mjukare. I vissa delar av Europa användes fjädrar.

Hårstrån från olika djurslag var det enda som fanns till handa till dess att Du Pont upptäckte nylonet (www, Colgate World of Care, 2010 och www, About, 2010). Upptäckten gjorde att det år 1938 började tillverkas en tandborste som var allt mer lik den som används idag. Allteftersom åren gick så ville folk ha ett mjukare nylon och så blev också fallet, 1950 introducerades det mjukare nylonet till tandborsten. Ett år senare efter att nylontandborsten började tillverkas gjordes den förste elektriska tandborsten.

Idag finns det mängder av olika tandborstar och eltandborstar med olika mjukhet på nylonet, form på borsten, storlek och grepp. Allt för att tandborstningen ska bli lättare och mer ergonomisk (www, Colgate World of Care, 2010 och www, About, 2010).

Tandkrämen ansågs ha använts av egyptierna runt 5000 f.kr. för att rengöra tänderna och den utvecklades innan tandborsten var påkommen (www, Colgate World of Care, 2010 och www, About, 2010). När tandkrämen kom var det av samma anledning som den används idag, att hålla tänderna rena och vita samt att ge en bra andedräkt. Ingredienserna i tandkrämen var väldigt varierande i olika delar av världen. Egyptierna använde sig av pulver av ox hovar, aska och bränt äggskal som kombinerades med pimpsten, en sorts gråsten från vulkaner, som även idag används som hudrengöring. Greker och Romare ville hellre ha mer strävhet i sin tandkräm och använde sig istället av malda ben och ostronskal. För att få mer smak och få en bättre andedräkt tillsatte Romarna, mald korall och bark. Kineserna använde sig av olika ämnen men de flesta innehöll ginseng, mintörter och salt.

Användningen av den mera moderna tandkrämen började vid 1800-talet, där tidigare innehåll utgjordes främst av såpa och år 1850 tillsattes även krita (www, Colgate World of Care, 2010 och www, About, 2010). Innan tandkrämen blev just tandkräm så var tandkrämens konsistens av pulvertyp. Under år 1850 kom en ny sorts tandkräm på burk som kallades Crème Dentifrice. Efter 1945 uteslöts såpa i tandkrämen och ersattes av ämnen som gjorde tandkrämen till den lena och emulgerande pasta som den är idag. Ämnet natriumlaurylsulfat (som fungerar som ett förtjockningsmedel och detergent) var ett av dem och detta används än idag.

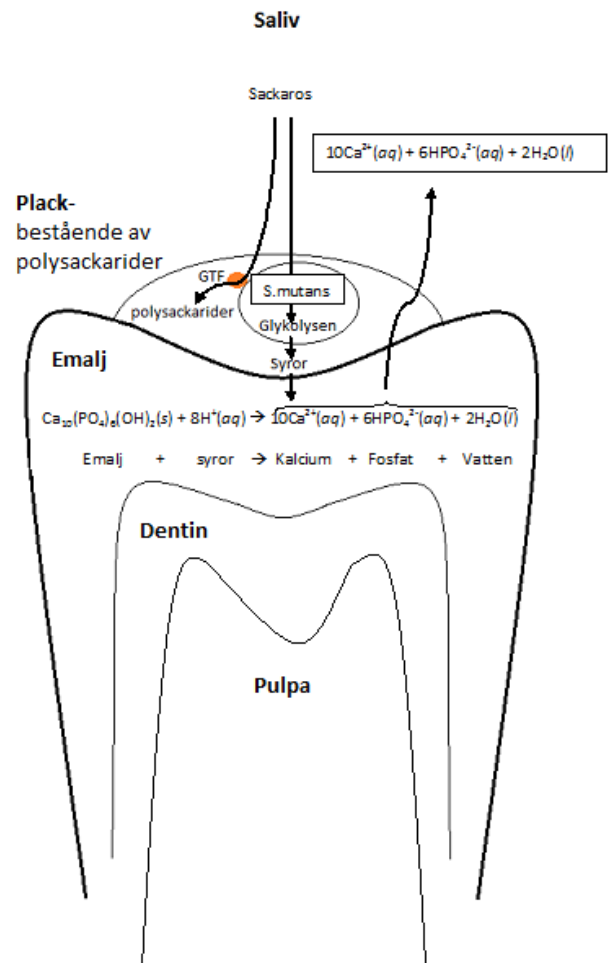
Fynd av tänder under 1900-talet har visat att karies och skador på tandrothinnan fanns i alla åldrar (Suddick et al, 1990). I nutid varierar tandsjukdomar mycket och detta har sin största förklaring i att dieten har förändrats.



Karies beror på en upplösning av tändernas olika anatomiska delar (Baron et al, 2010). Främst är det nedbrytningen av tandmineralet hydroxyapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , av syror som produceras av de olika syraproducerande bakterierna som finns i munhålan. Syrorna bildas av kolhydrater som återfinns i maten. De olika bakterierna i munnen bidrar till att det bildas plack. Plack är en biofilm vilken gör det lättare för organismer att utföra sina aktiviteter då de ger näringsämnen som bakterierna behöver.

Förr ansågs att alla bakterier i munfloran bildade karies (Baron et al, 2010). Så är inte fallet och främst är det *S. mutans* som primärt bildar de plack som senare andra syraproducerande bakterier kan leva och verka i. Under första och andra världskriget samt under Koreakriget var kariesfrekvensen så hög och allvarlig att många av de unga män som sökte militärtjänst inte fick ta värnning, vilket ledde till att tandläkaryrket blev ett separat vårdyrke i slutet av 1800-talet. Detta visade sig inte vara det mest effektiva och billiga alternativet, kostnaden för att utbilda tandläkare och att laga det amerikanska folkets tänder kostade folket 34 miljarder dollar per år under 1990-talet.

Det mest kostnadseffektiva sättet att minska problemen med karies visade sig vara fluorsköljning (Baron et al, 2010). 1914 introducerades fluortandkrämen vilket blev och är än idag den bästa förebyggande metoden mot karies. Individer som har ökad risk att få karies kan bli behandlade med olika metoder (Baron et al, 2010). Till exempel recept på olika fluorprodukter, antimikrobiella ämnen (till exempel klorhexidin), begränsning eller uteslutning av sackaros mellan måltider eller genom att använda sötningsmedel istället för sackaros (till exempel xylitol). Under 2000-talet har kariesinfektioner blivit kontrollerbara i takt med att människor har fått mer kunskap om hur karies förebyggs. Nästan 50 procent av de unga barnen i USA är idag kariesfria och antalet individer över 65 år som har en avsaknaden av tänder har minskat från 50 till cirka 20 procent.



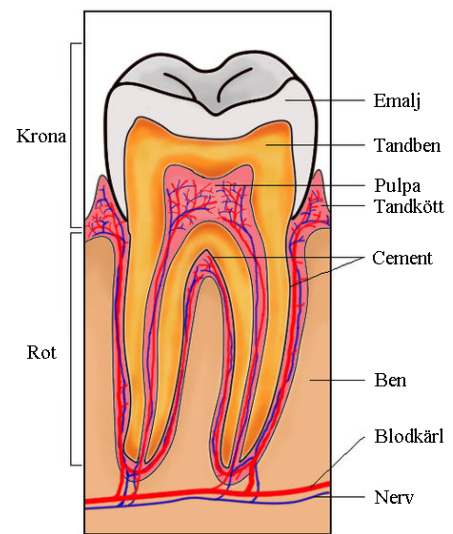
Figur 2. *S. mutans* angrepp mot tandytan (egen bearbetning)



## 5.1 Etiologi

Tandröta har länge varit känt men var inte ett särskilt stort problem förrän sackaros blev en huvudingrediens i många produkter (Baron et al, 2010). När sackaros konsumeras frekvent gynnas *S. mutans* och blir en dominerande organism. Det är denna mikroorganism som särskilt har förknippats med tandröta.

År 1942 isolerades *S. mutans* från skadade människotänder men den var inte helt studerad förrän under 1960-talet. Då identifierades den på nytt när kariesinfektion hos gnagare undersöktes (Baron et al, 2010). I dessa undersökningar var det svårt att visa att *S. mutans* var en humanpatogen, detta eftersom den är en normal del av munfloran. Det var även svårt att visa att en ökning av *S. mutans* skulle överensstämma med gamla studier om att bakterien gav skador på tänderna.



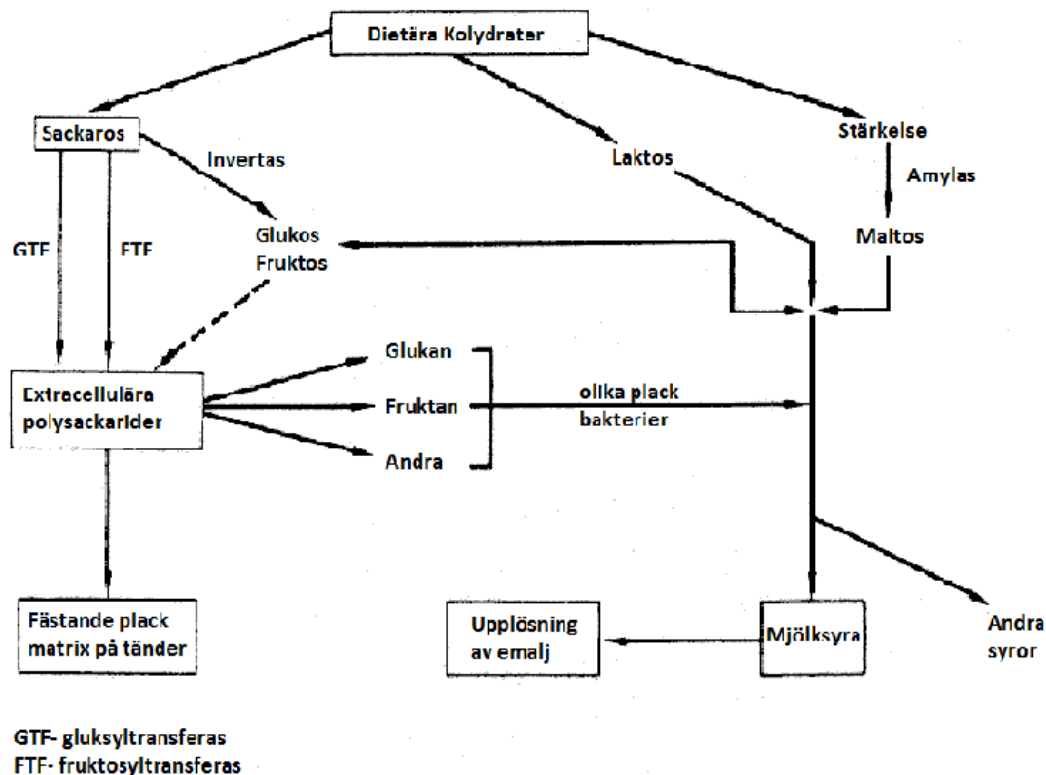
Figur 3. Tändernas anatomi (www, Rondini E, 2010)

Skador på tänderna kan ses som vita fläckar, så kallad kritkaries (www, Maria tandvård, 2010 och Baron et al, 2010). Kritkaries är begynnande karies, emaljen har då ännu inte lösts upp så mycket men det är en varningssignal på att emaljen är på väg att lösas upp och hål kan komma att uppstå. Dock är inte vita fläckar någon garanti på att det skulle vara kritkaries, det skulle kunna vara en störning i tandens mineralisering eller en missfärgning. Det beror på var de vita fläckarna sitter på tanden. Sitter de i tändernas klyftor, vid tandköttskanten eller vid tändernas mellanrum så är risken större att det är kritkaries.

*S. mutans* och laktobaciller finns normalt i munfloran hos alla individer men varierar i antal från person till person (Baron et al, 2010). När salivproduktionen minskar och pH i placken sänks så leder det en selektion av syretoleranta bakterier så som *S. mutans* och laktobaciller. Under utvecklingen av karies ökas proportionerna först av *S. mutans* och sedan av laktobacillerna signifikant. Denna ordningsföljd indikerar att *S. mutans* är involverad i bildningen av kariesskador medan laktobacillerna associeras till fortsatta angrepp på tänderna.

## 5.2 Sackaros i dieten

När sackaros finns tillgängligt för fermentation kommer pH mellan plack och emalj snabbt att sjunka ned till fem (Baron et al, 2010). Om sackaros konsumeras under måltiderna utsöndras tillräckligt med saliv för att buffra det låga pH-värdet och karies uppstår inte. Studier har visat att om två deciliter sackaros konsumeras via måltider under två års tid så resulterar det inte i hål. Om samma mängd konsumeras mellan måltider så resulterade det i tre till fyra nya hål per år. Om sackaros konsumeras under en längre tid kommer det också finnas sackaros i saliven under en längre tid. Det betyder att om sackaros finns tillgängligt för fermentation skulle det låga pH-värdet finnas kvar under en längre tid vilket resulterar i hål.



Figur 4. *S. mutans* metabolism av sackaros (www, University of Leeds, 2010)

Om pH-värdet inne i placket understiger fem kan inte saliven buffra mer och mjölksyra kommer då att börja lösa upp tandens emalj. Kalcium och fosfatjoner kommer att diffundera från tandemaljen ut i saliven. Normalt kommer saliven med nya mineraler som hade reparerat den uppstådda skadan men är salivproduktionen dålig eller om hålet uppstått på ett ställe där saliven har svårt att nå kommer detta att resultera i karies. *S. mutans* har visats kunna metabolisera sackaros på ett anmärkningsvärt sätt som ingen annan plackorganism kan (figur 4).

Det intressanta steget sker i energimetabolismen och i denna process används enzymet invertas för att bryta ned sackaros till dess beståndsdelar glukos och fruktos vilka i sin tur omvandlas till mjölksyra i glykolysen. För att bilda plack använder *S. mutans* ett annat enzym, glykosyltransferas (GTF) som används för att bryta ned sackaros men istället för att göra syra omvandlar den glukosmolekylen till glukospolymerer så kallade glukaner.

*S. mutans* bildar flera komplexa glukaner med olika kärnbindningar för att ge ett starkt fäste på tandytorna. De identifierade glukanerna har olika mycket förgreningar och molekylvikt. Dextran är en av glukanerna som bildas med 1→6 bindning i kärnan, medan mutan som är en annan glukon som *S. mutans* kan bilda har en 1→3 bindning i kärnan.

*S. mutans* har också fruktosyltransferas (FTF) ett enzym som kan dela sackaros och omvandla fruktosmolekylen till en fruktospolymer, fruktan (Baron et al, 2010). Andra placassocierade bakterier kan använda sackaros för att syntetisera en eller flera av dessa polymerer med undantag för mutan.

En mängd experiment *in vitro* har visat att glukaner gör att *S. mutans* kan fästa till tändernas yta (Baron et al, 2010). Detta kan betyda att dessa fästande polymerer gör att *S. mutans* kan fästa ordentligt på tandytan och börja ackumuleras där och därefter förorsaka karies i underliggande yta.

### 5.3 Får barn och ungdomar lättare hål i sina tänder?

Barn som får sina första tänder är mer känsliga för karies än vuxna. Om karies skulle uppstå hos barn blir skadan snabbare stor, vilket medför att tänderna kan behöva lagas (www, 1177, 2010). Tänderna kan laga sig själva genom material som kommer med saliven. Därför är det speciellt viktigt för barn och ungdomar att hålla en bra munhygien. När tänderna röntgas kan en början till hål ses, dessa hål behöver inte alltid bli värre och det är inte säkert att de behöver lagas. Det kan vara bra att börja med fluortandkräm så tidigt som möjligt för att undvika kariesproblem. Barn som har kvar sina mjölk tänder är ännu känsligare för kariesangrepp då dess emalj är tunnare än på de permanenta tänderna.

### 6. Fluortanten

Från 60-talet och framåt slutet av 80-talet hade de svenska skolbarnen obligatorisk fluorsköljning, uppgiften skötte av en så kallade Fluortant (www, Allt om dina tänder, 2010). Hon hade även föreläsningar om munhälsa och hur barnen bäst skulle sköta sina tänder. Hennes besök fick ungdomar att regelbundet fundera över sina tänder, men tyvärr drogs av besparingsskäl det obligatoriska fluorsköljandet i Sveriges skolor in i slutet av 80-talet.

### 7. Probiotika

Ordet probiotika betyder ”för livet” och associeras idag med positiva hälsoeffekter av tillförda mikroorganismer på både djur och människor. Detta kan jämföras med antibiotika som betyder ”mot livet” (www, EB, 2010 och FAO/WHO, 2001). Probiotika är så kallade ”goda” bakterier och används för att skydda oss mot de ”onda” bakterierna eller på annat sätt skydda mot sjukdom. Det kan kännas lite konstigt att bakterier, vilka i daglig mun förknippas med sjukdomar, används, men faktum är att bakteriers förmåga att bilda mjölksyra har utnyttjats i århundraden. Detta för att förlänga hållbarheten och fermentera olika livsmedel som till exempel ostar. Probiotika finns idag i många olika produkter som riktar in sig på olika problem, probiotikans agerande gällande skadliga organismer listas nedan (Spiller et al, 2008)

- Konkurrens om näring med de skadliga organismerna
- Hindrar att patogener kan binda till epitelceller i tarmen
- De kan producera antimikrobiella substanser (till exempel väteperoxid) som kan hämma eller döda patogener

Förutom att mjölksyrabakterierna ger skyddande effekter bidrar de också med smak och konsistens.

### 7.1 Probiotikans historia

Metoder för att konservera mat har varit kända i många årtusenden (Schrezemeir et al, 2001). Sättet som det konserverades på förr var genom fermentering och det har konstaterats att detta användes redan vid stenåldern då gropar som kan ha använts till detta ändamål har upptäckts. Genom att gräva ned kött i gropar så minskade tillförseln av syre och fermentering kunde ske, vilket i sin tur minskade förruttnelseprocessen. Redan i den persiska versionen av gamla testamentet sägs det att (1:a Moseboken 18:8):

*“Abraham owed his longevity to the consumption of sour milk.”*

vilket menas att Abraham levde längre efter att ha druckit sur mjölk (Schrezemeir et al, 2001). År 76 före Kristus kom den romerska historikern Plinius att rekommendera folket att äta fermenterade mjölkprodukter för att behandla mag- och tarminfektioner.

Det var inte förrän den ryskfödde biologen Eli Metchnikoff (1845-1916) som arbetade på Pasteur-institutet i början av förra århundradet observerade den positiva roll som vissa bakterier kunde ha (FAO/WHO, 2001). Metchnikoff tillskrevs epitetet ”probiotikans fader” och han fick nobelpriset 1908, men inte för observationen på bakteriers positiva roll utan för cellulär resistens. År 1907 hävdade Metchnikoff att:

*“The dependence of the intestinal microbes on the food makes it possible to adopt measures to modify the flora in our bodies and to replace the harmful microbes by useful microbes”*

Han menade att tarmfloran kan förändras genom maten vi äter och genom att byta ut skadliga organismer mot goda (FAO/WHO, 2001). Samtidigt som Metchnikoff hävdade detta påpekade en fransk barnläkare vid namn Henry Tissier att barn med diarré hade ett lågt antal Y formade bakterier i avföringen. Dessa ”bifido”-bakterier fanns i motsatts till sjuka barn mer hos friska barn. Tissier hävdade då att dessa bakterier kunde användas till patienter med diarré för att återställa till en normal tarmfloran. Även om Metchnikoff och Tissier kom med de första vetenskapliga förslagen till användningen av probiotika så myntades inte termen probiotika förrän 1974 av Parker. Han definierade probiotika som (Schrezemeir et al, 2001):

*“organisms and substances which contribute to intestinal microbial balance.”*

När Parker använde ordet substances i sin definition inkluderade det också antibiotika (Schrezemeir et al, 2001). År 1989 försökte Fuller att förbättra Parkers definition med följande åtskillnad:

*“A live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance”*

Denna uppdaterade definition lyfte fram behovet och de positiva hälsoaspekter av probiotika hos värden, som enligt definitionen var ett djur (Schrezemeir et al, 2001). År 1992 kom Havenaar et al med en bredare definition av probiotika med hänseende på värden och mikrofloran:

*"A viable mono- or mixed culture of microorganisms which applied to animal or man, beneficially affects the host by improving the properties of the indigenous microflora"*

Den senaste definitionen av probiotika kom från Guarner och Schaafsma, 1998, som även WHO och FAO använder idag, den lyder (Schrezeimeir et al, 2001 och FAO/WHO, 2001):

*"Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host"*

Dessa olika definitioner har gjort att många produkter inte får kalla sig probiotiska (Schrezeimeir et al, 2001 och FAO/WHO, 2001). Efter Metchnikoffs och Tissiers uttalande om den goda effekt som probiotika kunde medföra blev det kommersiella användandet stort. Men deras resultat var inte alltid positiva vilket gjorde att probiotika sågs som vetenskapligt obevisad. Detta gjorde att intresset för probiotika började sjunka under årtiondena. Men de gångna tre decennierna har forskningen gjort stora framsteg med karakterisering av probiotiska kulturer som kan användas för att ge en bättre hälsa. Allt eftersom nya produkter och ingredienser lanserats ökade också kraven på forskningen och dokumentationen av produkterna. De släkter som används till probiotika är nästan helt uteslutande *Lactobacillus* och *Bifidobacterium*.

## **8. T-RFLP**

Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP är ett mycket effektivt sätt att visa hur sammansättningen av olika bakterier varierar i olika ekosystem (Dicksved J, 2008 och Nakano Y et al, 2008). Metoden går ut på att märka PCR-produkten med en fluorescerande molekyl. Med hjälp av restriktionsenzymer kommer produkten att klyvas men bara de fragment som är märkta kommer att detekteras vid en efterföljande elektrofores. Elektroforesen är kopplad till en detektor som automatiskt detekterar fluorescerande molekyler. Sekvens-polymorfism mellan arter ger heterogena fragmentlängder, TRFer och deras korresponderande längder (baspar). Intensiteten av fluoresensen registreras också och ses som en kvantitativ mätning av mängden av individuella TRFer. Denna kvantitativa mätning ska endast ses som en relativ kvantifiering, det vill säga den relativa mängden TRFer. Genom att analysera storleken och mängden av TRFer kan olika prover jämföras med varandra och se hur fördelningen av bakterier förändras under tiden. T-RFLP kan användas för att se skillnader på TRFer eller dominanta populationer i en mikrobiota. T-RFLP har använts med goda resultat i till exempel förändringar av mikrobiotan vid intag av antibiotika, förändringar i feces hos allergiker och förändringar i orala mikrobiotan (Dicksved J, 2008 och Nakano Y et al, 2008). En nackdel som T-RFLP har är att datan inte är pålitlig som identifiering, på grund av att länken mellan TRFer och olika bakteriearter har brister. En annan nackdel är att en TRF kan potentiellt härstamma från flera orelaterade arter.

## 9. Tidigare studier av probiotika mot karies

### 9.1 *Lactobacillus reuteri* i tabletter och sugrör

#### Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straw or tablets

(Esber Caglar<sup>1</sup>, Sule Kavaloglu Cildir<sup>1</sup>, Semra Ergeneli<sup>1</sup>, Nuket Sandalli<sup>1</sup> & Svante Twetman<sup>2</sup>)

<sup>1</sup>Department of Paediatric Dentistry, Dental School, Yeditepe University, Istanbul, Turkey and <sup>2</sup> Department of Odontology, Pediatric Dentistry, Faculty of Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden and Department of Cariology and Endodontics, School of Dentistry, Faculty of Health Science, University of Copenhagen, Denmark.

Målet med studien var att se hur korttidskonsumtion av vatten genom ett preparerat sugrör med probiotika eller tabletter som innehåller *Lactobacillus reuteri* kunde påverka nivåerna av streptokocker och laktobaciller hos unga vuxna.

Studien bestod av 120 friska ungdomar i åldern 21-24 år, fördelningen var 71 män och 49 kvinnor. Fyra veckor innan studien påbörjades fick deltagarna inte ha konsumerat antibiotika, probiotika eller tuggummi med xylitol, de fick inte heller göra någon form av fluorbehandling under dessa veckor. Deltagarna hade en normal munhälsa; inga obehandlade kariesskador eller tecken på blödande tandkött.

Studien pågick i tre veckor och deltagarna delades in i fyra grupper: Grupp A fick dricka vatten genom ett sugrör som var preparerat med probiotika, Grupp B fick dricka vatten genom ett sugrör med placebo. Grupp C fick en probiotisk tablett och Grupp D fick en placebotablett. Varje grupp bestod av 30 deltagare.

Deltagarna fick information om att de skulle fortsätta med normal munhygien och borsta tänderna två gånger per dag. Salivproven togs vid tidpunkten noll och en dag efter den sista sugröret och tabletten togs. För att stimulera salivproduktionen användes paraffinkapslar. Både sugröret och tabletterna innehöll *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 med  $10^8$  CFU per sugrör eller tablett.

Tabell 1 Resultatet visade att *S. mutans* minskade signifikant.

Tid	n	<i>S. mutans</i> poäng(CFU)				P
		0 Ingen tillväxt	1 $\leq 10^4$	2 $10^5$	3 $\geq 10^6$	
<b>Grupp A</b> (prob.sugrör)						
Tidpunkt 0	30	6	4	5	15	
3 veckor	30	9	6	14	1	<0,05
<b>Grupp B</b> (placebo sugrör)						
Tidpunkt 0	30	6	9	9	6	
3 veckor	30	8	7	8	7	NS
<b>Grupp C</b> (prob. tablett)						
Tidpunkt 0	30	9	5	5	11	
3 veckor	30	17	2	8	3	<0,01
<b>Grupp D</b> (placebo tablett)						
Tidpunkt 0	30	13	5	5	7	
3 veckor	30	12	6	6	6	NS

CFU= colony forming unit, NS= not significant

Tabell 2 Resultatet visade att laktobaciller förblev oförändrad.

Tid	n	Lactobacillus poäng(CFU)				P
		0 $\leq 10^3$	1 $10^4$	2 $10^5$	3 $\geq 10^6$	
<b>Grupp A</b> (prob.sugrör)						
Tidpunkt 0	30	9	13	5	3	NS
3 veckor	30	15	9	3	3	
<b>Grupp B</b> (placebo sugrör)						
Tidpunkt 0	30	12	10	3	5	NS
3 veckor	30	15	5	7	3	
<b>Grupp C</b> (prob. tablett)						
Tidpunkt 0	30	14	5	5	6	NS
3 veckor	30	18	4	7	1	
<b>Grupp D</b> (placebo tablett)						
Tidpunkt 0	30	19	3	8	-	NS
3 veckor	30	19	5	6	-	

CFU= colony forming unit, NS= not significant

Resultatet blev, som ses i tabellerna, att både tabletterna (grupp C) och sugröret (grupp A) hade signifikanta minskningar av *S. mutans*,  $p < 0,05$  sugrör,  $p < 0,01$  tablett. Däremot fanns inga signifikanta skillnader på laktobacillerna för någon av produkterna.

## 9.2 *Lactobacillus reuteri* i tuggummi

**Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli** (E. Çaglar & S. C. Kavaloglu & O. O. Kuscü & N. Sandalli & P. L. Holgersson & S. Twetman)

Målet med studien var att jämföra effekten av xylitol med probiotiska tuggummin samt att se hur effekten blev om dessa kombineras. Nivån av *S. mutans* och *Lactobacillus* jämfördes efter konsumtion av xylitol och probiotiska tuggummin.

Studien bestod av 80 friska ungdomar i åldern 21-24 år, 44 kvinnor och 36 män. Deltagarna fick inte konsumera någon antibiotika eller använda fluorprodukter. De fick inte heller ha konsumerat probiotika eller tuggat tuggummi med xylitol under fyra veckor innan studien startade.

Studien pågick i tre veckor och deltagarna blev uppdelade i fyra grupper: Grupp A fick ett probiotiskt tuggummi tre gånger per dag, grupp B fick två xylitoltuggummi tre gånger per dag, grupp C fick två probiotiska tuggummin och fyra xylitoltuggummin per dag och grupp D fick ett placebotuggummi utan några aktiva ämnen i. Varje grupp bestod av 20 deltagare.

Deltagarna fick information om att de skulle fortsätta med normal munhygien och borsta tänderna två gånger per dag. Salivprov togs vid tidpunkten noll och en dag efter sista tuggummit konsumerades. För att stimulera salivproduktionen användes paraffinkapslar.

Tid	n	<i>S. mutans</i> poäng <sup>1</sup>				<i>p</i>
		0	1	2	3	
<b>Grupp A</b> (probiotika)						
Tidpunkt 0	20	7	2	5	6	<0,05
3 veckor	20	12	5	3	0	
<b>Grupp B</b> (Xylitol)						
Tidpunkt 0	20	6	3	4	7	<0,05
3 veckor	20	7	5	8	0	
<b>Grupp C</b> (Probi. + Xylitol)						
Tidpunkt 0	20	5	5	7	3	NS
3 veckor	20	5	8	6	1	
<b>Grupp D</b> (Placebo)						
Tidpunkt 0	20	6	4	6	4	NS
3 veckor	20	7	5	4	4	

Siffrorna i tabellen= antal deltagare, NS= not significant difference.

<sup>1</sup>Poäng 0= 0-10 CFU; Poäng 1= 11-99 CFU; Poäng 2= 100-500 CFU; Poäng 3= >500 CFU

Tid	n	Lactobacillus (CFU/ml)				<i>p</i>
		$\leq 10^3$	$10^4$	$10^5$	$\geq 10^6$	
<b>Grupp A</b> (probiotika)						
Tidpunkt 0	20	5	6	4	5	NS
3 veckor	20	8	6	3	3	
<b>Grupp B</b> (Xylitol)						
Tidpunkt 0	20	5	8	2	3	NS
3 veckor	20	15	3	1	1	
<b>Grupp C</b> (Probi. + Xylitol)						
Tidpunkt 0	20	2	4	8	6	NS
3 veckor	20	7	3	7	3	
<b>Grupp D</b> (Placebo)						
Tidpunkt 0	20	3	8	7	2	NS
3 veckor	20	4	9	5	2	

Siffrorna i tabellen= antal deltagare

NS= not significant

Resultatet blev, som tabellerna visar, att grupp B (xylitol) och grupp A (probiotika) fick signifikanta skillnader ( $p < 0,05$ ), medan grupp C som fick både probiotika och xylitol inte fick någon signifikant skillnad. Detta kan bero på att xylitol är bakteriehämmande och gjorde förutom att hämma *S. mutans* att också *L. reuteri* hämmades. Det fanns inga signifikanta skillnader på laktobacillerna för de olika produkterna.



### 9.3 *Lactobacillus reuteri* i barnnappar

#### A probiotic lozenge administrated medical device and its effect on salivary mutans

**streptococci and lactobacilli** (Esber Caglar, Ozgur Onder Kusch, Sule Kavaloglu Cildir, Senem Selvi Kuvvetli & Nuket Sandalli)

Department of Paediatric Dentistry, Dental School, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

Målet med studien var att undersöka effekten av *Lactobacillus reuteri* som levererades med en ny medicinskt uppfinning. Uppfinningen var en napp till barn som innehöll en probiotisk tablett i gummipåsen av nappen. Gummit hade 0,5 millimeter stora hål där den upplösta probiotikan kunde komma ut och verka. Nivåerna av *S. mutans* och laktobaciller jämfördes hos unga kvinnor med hög nivå av *S. mutans*.

Studien var randomiserad, dubbelblind och placebokontrollerad och bestod av 20 unga kvinnor i tjugoårsåldern, 10 av dem fick aktiv produkt medan 10 fick placebo som kontroll.

Klinisk data visade att ju senare tänderna koloniserades av *S. mutans* desto mindre sannolikhet att karies uppstår, om de gör de överhuvudtaget. Men av etiska skäl kunde inte barn användas i studien så istället användes gravida kvinnor med hög nivå av *S. mutans* ( $\geq 10^5$  CFU per tablett).

Studien varade i tio dagar och vid urvalet fick deltagarna inte ha använt probiotika eller antibiotika två veckor innan studien började. Produkten skulle tas på förmiddagen och tog ca 15 minuter att använda, tandborstning var inte tillåtet minst en timma efter användandet av produkten.

Salivproven togs före och efter tiodagars perioden, paraffinkapslar användes för att stimulera salivproduktionen.

		Probiotika	grupp	Placebo	grupp	<i>p</i>
Tidpunkten 0						
(förbehandling)						
<i>S. mutans</i> poäng, CFU/ml						
0	Ingen tillväxt	0		0		NS
1	<10 <sup>5</sup>	0		0		
2	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	6		6		
3	>10 <sup>6</sup>	4		4		
10 dagar (efterbehandling)						
0	Ingen tillväxt	0		0		0,016*
1	<10 <sup>5</sup>	3		0		
2	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	7		5		
3	>10 <sup>6</sup>	0		5		
<i>P</i>		0,016**		NS		

\* $\chi^2$ -test \*\*McNemar test

		Probiotika	Grupp	Placebo	grupp	<i>p</i>
Tidpunkten 0 (förbehandling)						
lactobacillus, CFU/ml						
0	≤10 <sup>3</sup>	0		0		NS
1	10 <sup>4</sup>	5		5		
2	10 <sup>5</sup>	5		3		
3	≥10 <sup>6</sup>	0		2		
10 dagar (efterbehandling)						
0	≤10 <sup>3</sup>	0		0		NS
1	10 <sup>4</sup>	4		2		
2	10 <sup>5</sup>	5		5		
3	≥10 <sup>6</sup>	1		3		
<i>P</i>		NS		NS		

$\chi^2$ -test och McNemar test

Resultatet som ges i tabellerna ovan visar att *S. mutans* nivåerna i probiotika gruppen minskade signifikant ( $p < 0,05$ ) under en tiodagars behandling men att laktobacillerna inte uppvisade några signifikanta skillnader. Detta är vid jämförelse med de andra ovanstående studier samma signifikanta skillnad  $p = 0,05$ .

#### 9.4 *Lactobacillus rhamnosus* GG i mjölk

##### Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children

L. Näse, K. Hatakka, E. Savilahti, M. Saxelin, A. Pönkä, T. Poussa, R. Korpela, J.H. Meurman

*Lactobacillus rhamnosus* GG, (LGG), har visat antagonism till många bakterier inklusive *S. mutans*. Studien var randomiserad, dubbelblind och placebokontrollerad och gick ut på att undersöka om mjölk som innehöll LGG har någon effekt på karies och risken av karies hos barn vid jämförelse med vanlig mjölk. 594 barn i åldrarna ett till sex år från 18 olika kommunala dagis inkluderades i försöket. Barnen fick mjölken med maten från kodade behållare fem dagar i veckan på dagis under sju månader.

Barnens orala hälsa noterades vid studiens början och vid studiens slut. Kariesrisken räknades ut baserat på kliniska och mikrobiella data, vilket *S. mutans* nivåer från plack och saliv inkluderades. Risken klassificerades som hög om barnen hade dmft/DMFT (tandläkarnas kariesindex, DMFT= Decayed, Missing, Filled Teeth, permanenta tänder, dmft= primära tänder) eller begynnande karies poäng  $>0$ , och en *S. mutans* mängd på  $\geq 10^5$  CFU/ml. Resultatet visade mindre karies i LGG gruppen och lägre nivå av *S. mutans* vid slutet av studien. LGG visade sig minska risken av karies signifikant  $p = 0,01$ . Effekten var särskilt stor hos tre till fyraåringar. Slutsatsen är att mjölk som innehåller probiotikan LGG har hälsosamma effekter på barns tandhälsa.

## 10. Material och metod

### 10.1 Media optimering

#### 10.1.1 *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289

Innan studien började fanns inget substrat som *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 kunde odlas selektivt på. Med hjälp av referens (pers.:med.: Roos,2009) kunde ett substrat göras. Substrat gjordes med kunskapen att stammen klarar höga nivåer av galla. Olika koncentrationer av griskalla användes för att optimera substratet vilket tabellen nedan visar. Andra bakterier togs upp från -70 grader i frysen för att se hur selektivt substratet var för ATCC 5289. Bakteriestammarna som användes var: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*. Dessa fick sedan växa i MRS buljong, 37°C i två dygn. En 100x spädningsserie gjordes sedan där spädningarna  $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  användes, från spädningsserierna togs 10 respektive 100 µl av bakteriesuspensionen och racklades ut på plattorna. Plattorna inkuberades sedan anaerobt vid 37°C i två dygn.

##### 10.1.1.1 Konfirmering av *Lactobacillus reuteri*

Genom att använda PCR med specifika primers för *L. reuteri* kunde en verifiering göras av *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 och *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (pers.:med.: Roos,2009).

Varje koloni som skulle konfirmeras togs och slammades upp i 10 µl sterilt vatten i PCR rör med hjälp av en tandpetare. Kolonierna togs från laktobacillus plattorna, MRS med galla och Rogosa ampicilin. Primerna som användes var:

A: LR2/0733f (GACAGTGGCTAAACGCCTTC) och r(AATTCCACTTGCCATCTTCG)

B: SNP1\_5289: (TTCCTGATCTTTTCCGGAA) och SNP1r (TTGTCTTTGTTCCACGAGCA)

D: LR1/1694f: (TTAAGGATGCAAACCCGAAC) och r(CCTTGTCACCTGGAACCACT)

Kolonierna som växte på MRS galla motsvarar *L. reuteri* ATCC PTA 5289 och preparerades med primerna A och B separat i olika PCR-rör. Kolonierna från Rogosa ampicilin som användes för att selektera för *L. reuteri* DSM 17938 preparerades och analyserades med primern D.

För varje reaktion och koloni tillsattes primerna A och D, separat till ett PCR-rör, blandades med 5 µl DreamTaq green (Fermentas, Ontario, Canada) och 5 µl av primermixen.

Primer B kördes med *HOT start*, vilket gör att ospecifik amplifiering reduceras. Därför sätts primern till ca 30 sekunder efter PCR programmets start (95°C). För varje koloni och reaktion tillsattes primer B, 5 µl DreamTaq green och 3 µl vatten.

Sist tillsattes 0,2 µl av den uppslammade bakterielösningen till respektive PCR-rör.

Programmet som kördes var Hot -62: 95°C 7 minuter; 35x(95°C, 30 sekunder; 62°C, 30 sekunder; 72°C, sekunder); 72°C, 10 minuter i Bio-Rad c1000 ThermalCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

PCR-produkterna kördes sedan på 1% agarosgel i  $0,5 \times$  TBE buffert med ethidiumbromid som infärgningsreagens. Gelen kördes ca 45 minuter vid 100 V. Storleken på PCR-produkten bestämdes med jämförelse av 100 baspar stege (Fermentas, Ontario, Canada).

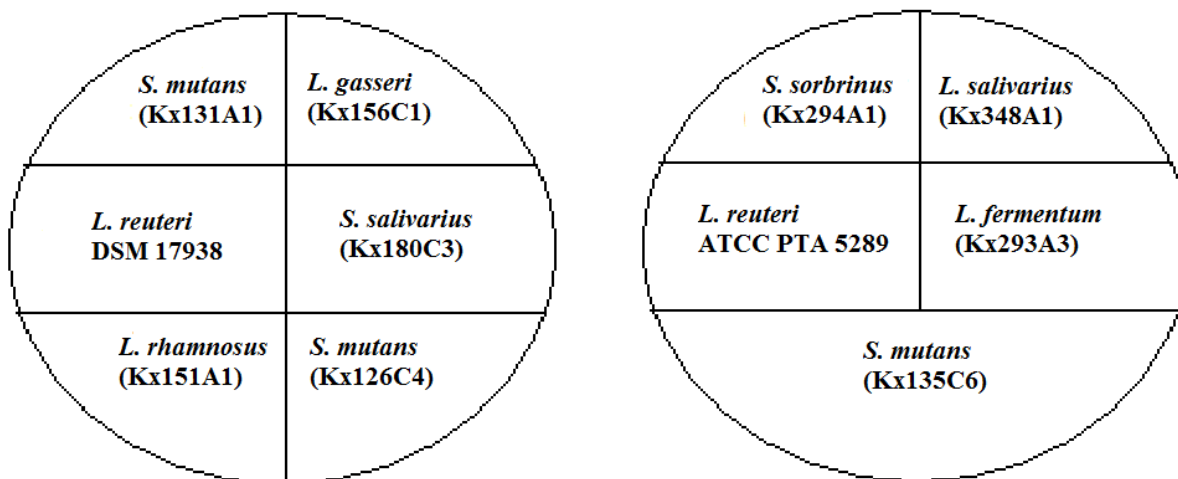
### 10.1.3 *Streptococcus mutans*

Substrat för *S. mutans* gjordes utefter referens (pers.:Härse.:2010).

Substratet var designat för att *S. mutans* skulle växa och andra organismer hämmas. De andra stammarna testades också för att påvisa selektiviteten av substratet för *S. mutans*.

Bakteriestammarna som användes var: *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*. Dessa fick sedan växa i MRS buljong, 37°C i två dygn.

Två µl sattes till plattan utan att racklas ut och plattorna inkuberades sedan i anaerobklockor med Gaspak vid 37 grader i två dygn.



Figur 5. Visar placeringen av de olika bakterierna på plattorna (egen bearbetning)

### 10.1.3.1 Konfirmering av *S. mutans*

#### 10.1.3.2 DNA amplifiering

För varje 25 µl reaktion användes 16s primrarna F8m och 926r (10 pmol av vardera), MilliQ vatten och DreamTaq green (Fermentas, Ontario, Canada). För varje reaktion behövdes 0,6 µl av F8m, 0,5µl av 926r, 11,95µl MilliQ H<sub>2</sub>O och 13,05 µl av DreamTaq green, totalvolym 25 µl. Genom att räkna ut hur många reaktioner som skulle analyseras kunde en mastermix göras, sedan sattes 25 µl av mastermixen till varje PCR rör.

PCR kördes direkt på de kolonier vilka skulle sekvenseras. Kolonierna plockades med en tandpetare och sattes till de olika PCR-rören. PCR-programmet: 30x (95°C,30 s;49°C,30 s;72°C, 60); 95°C, 5 minuter; 4°C, ∞ kördes på PCR produkterna (pers.:med.: Roos,2009) i Bio-Rad c1000 ThermalCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

PCR -produkterna kördes sedan på 1% agarosgel i  $0,5 \times$  TBE buffert med ethidiumbromid som infärgningsreagens.(Detta för konfirmera att utförandet och PCR-programmet hade fungerat.) Gelen kördes ca 45 minuter vid 100 V. Storleken på PCR produkten bestämdes med jämförelse av 100 bp eller 1 kb stegar (Fermentas, Ontario, Canada).

### 10.1.3.3 DNA-rening och sekvensering

PCR-produkten renades enligt tillverkarens instruktioner om användandet av QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Slutvolymen på den renade produkten blev 21 µl. Koncentrationerna kvantifierades med NanoVue spectrophotometer (GE Health Care Life science, Little Chalfont, UK). Sekvenseringen genomfördes av Uppsala Genome Center, Rudbeck Laboratoriet, Uppsala, Sverige. Proverna som skickades till Rudbeck laboratoriet innehöll 15-30 ng templat (500-1000 baspar) och 4 pmol primer/18 µl reaktion.

Alla sekvensresultat behandlades manuellt genom användandet av, FinchTV (Geospiza, Seattle, WA, USA), och 4Peaks (Mekentosj B.V, Amsterdam, Nederländerna)

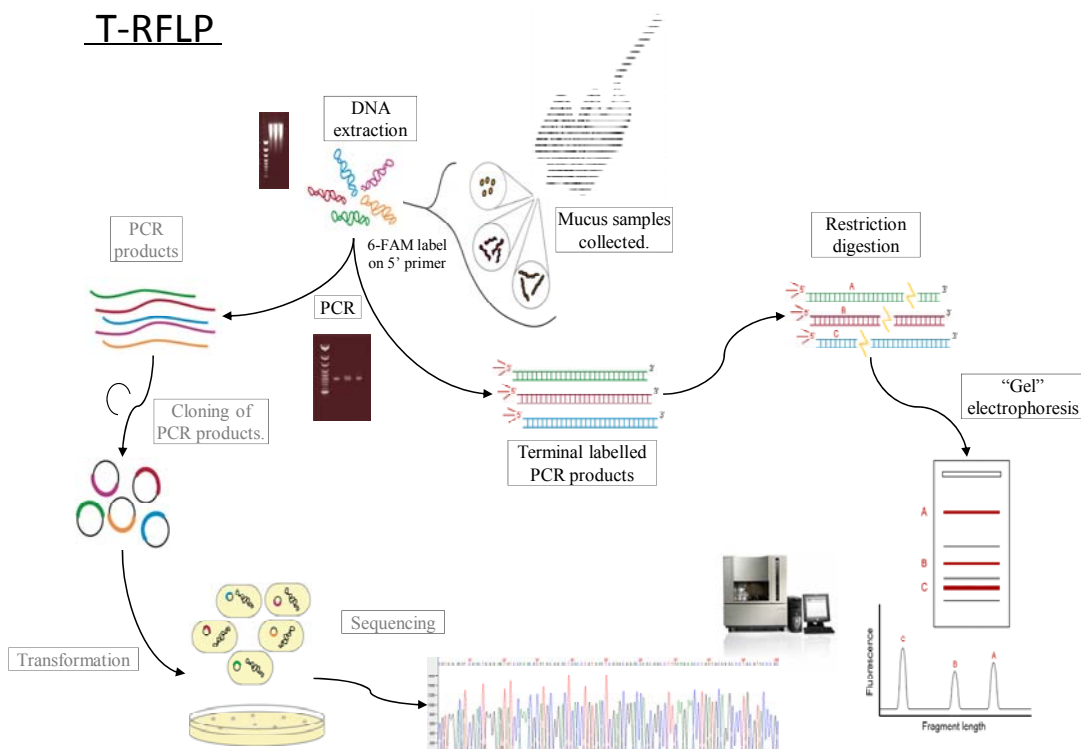
Dessa resultat användes sedan i BLAST analysen på <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> och i Ribosomala databasen i <http://rdp.cme.msu.edu>.

## 11. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

Salivproven som hade förvarats med glycerol vid -70°C togs upp och tinades på is. 0,5 ml av saliven fördes över till 2 ml vialer. Dessa centrifugerades i 4 minuter vid 13000 rpm. Supernatanten som bildades togs bort med pipett. Provet vägdes så max 30 mg fanns kvar. 180 µl av Tissue lysis buffer (ATL) tillsattes till pelleten och lösningen blandades genom vortexning. Den blandade lösningen fördes över till vialer med en bädd av 0,1 mm zirkoniumkulor (Zirkonium används för att slå sönder cellmembranen för att komma åt innehållet). 200 µl proteinas K tillsattes som sedan sattes i ett 56°C värmeblock i ca 15 minuter tills vävnaderna lyserats. 400 µl Lysis buffer (AL) tillsattes till provet och vortexades genom puls-vortexning i 15 sekunder. Provet inkuberades sedan vid 70°C i 10 minuter i värmeblocket. Från vialerna med zirkonium fördes lösningen över till nya 2 ml eppendorfrör och 400 µl etanol (96-100%) tillsattes. Lösningen puls-vortexades i 15 sekunder, och centrifugerades sedan för att få bort eventuella droppar i locket. Efter centrifugeringen fördes 600 µl över till filterkolumner dessa fick på nytt centrifugeras vid 8000 rpm i 1 minut (Eftersom uppsamlingsröret bara rymmer 600 µl fick detta steg upprepas). 500 µl AW1 buffert tillsattes och centrifugerades vid 8000 rpm i 1 minut, och det som runnit igenom kastades. Filtret sattes i ett nytt 2 ml uppsamlingsrör och 500 µl av AW2 tillsattes som sedan centrifugerades vid 14000 rpm i 3 minuter. I sista steget sattes filtret i ett nytt 1,5 ml eppendorfrör och 200 µl elueringsbuffert (AE) tillsattes. Lösningen inkuberades vid rumstemperatur i 1minut och centrifugerades sedan vid 8000 rpm i 1 minut.

16S rRNA gener amplifierades från det isolerade DNAt med primrarna Batc 8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 5' var ändmärkt med 6-carboxyfluorescein (6-FAM) och 926r (5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT-3')(Dicksved J, 2008). Med 25 µl reaktioner användes PuReTaq Ready-To-Go (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) och kördes med PCR-programmet: 30x (94°C, 40 s; 55°C, 40 s; 72°C, 60); 94°C, 5 minuter; 4°C, ∞ (pers.: med.: Roos, 2009) i Bio-Rad c1000 ThermalCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCR-produkterna kördes sedan på 1% agarosgel i 0,5 × TBE buffert med ethidiumbromid som infärgningsreagens för konfirmering. Detta för konfirmera att utförandet och PCR-programmet hade fungerat. Gelen kördes ca 45 minuter vid 100 V. Storleken på PCR-produkten bestämdes med jämförelse av 100 bp steg (Fermentas, Ontario, Canada).

PCR- produkten klövs med restriktionsenzymet *Hae*III (GE Healthcare, Uppsala, Sverige) och de resulterande fragmenten separerades sedan med hjälp av ABI 3700 kapillär sekvenseringsmaskin. Storleken på de fluorescerande fragmenten bestämdes genom jämförelse med GS ROX-500 intern storleksstandard (Applied Biosystems (ABI), Foster city, CA, USA). Genom att använda GeneScan software (ABI) kunde ett T-RFLP elektroforogram göras. Relativa toppareor för varje terminalt restriktionsfragment (TRF) bestämdes genom att dela den intressanta toppens area med den totala arean av alla toppar inom ett tröskelintervallet. Det nedre tröskelvärde ligger runt 50 bp och den övre ligger runt 500 bp. Ett tröskelvärde för relativ förekomst sattes till 0,25 % och bara TRFer med högre relativ förekomst inkluderades i den fortsatta analysen.



**Figur 6. T-RFLP metoden (Dicksved J, 2008)**

Profilen med de olika fragmenten kan analyseras i programmen PeakScanner (www, Applied Biosystems, 2010) och Past som är ett statistiskt, plotting- och modellprogram

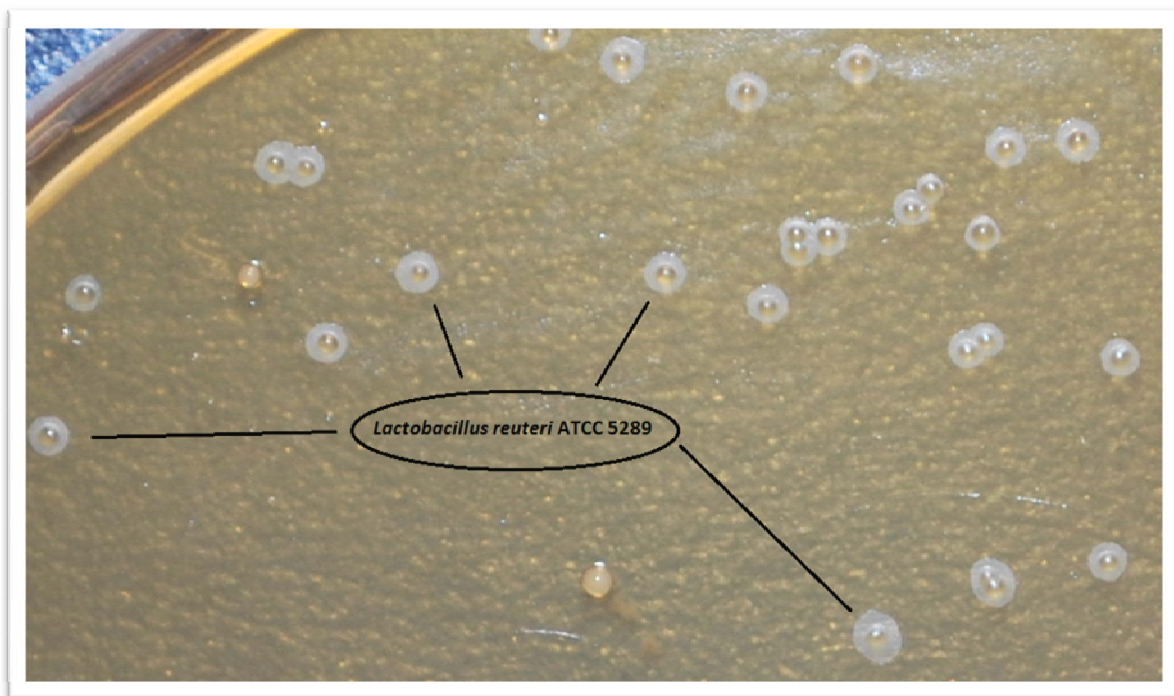
## 12. Resultat

### 12.1 Optimering av odlingsmedium

Resultatet vid mediaoptimeringen för *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 visade sig vara god, griscgallan hämmade många av de kontrollstammar som användes och *L. reuteri* stammen växte mycket bra. Kolonierna som bilden nedan visar är runda med en zon av hydrolyserad galla.

Tabell 3 Resultat från optimering av substrat till ATCC 5289

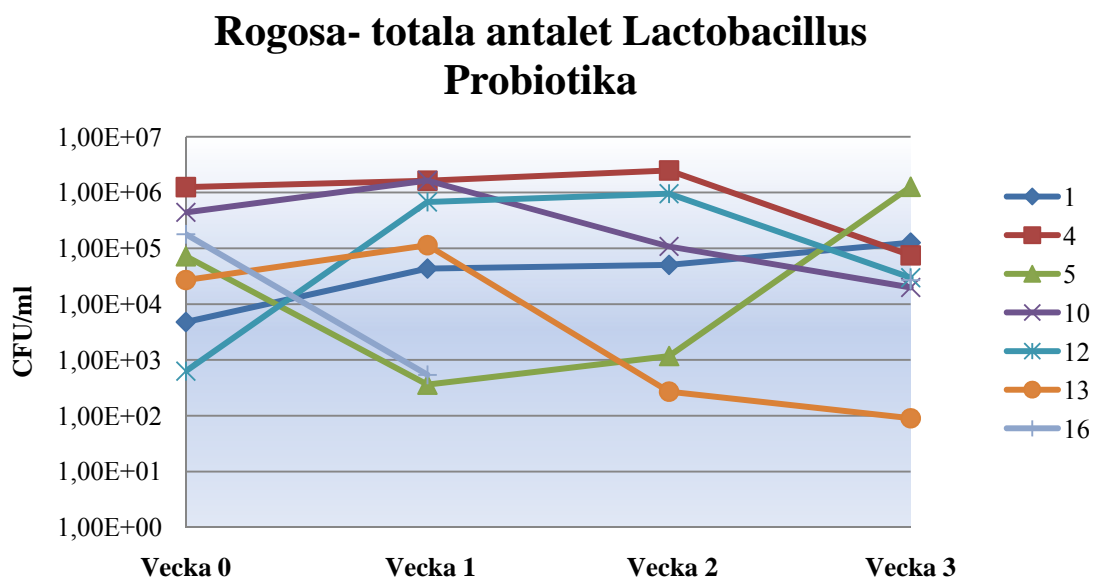
ATCC 5289 100x spädning	Griscgalla			
	0,1%	0,3%	0,5%	1,0%
10 <sup>1</sup> 10µl	6	0	2	0
10 <sup>1</sup> 100µl	4	3	3	5
10 <sup>3</sup> 10 µl	32	32	35	26
10 <sup>3</sup> 100 µl	176	169	163	159
10 <sup>5</sup> 10 µl	>300	>300	>300	>300
10 <sup>5</sup> 100 µl	>300	>300	>300	>300



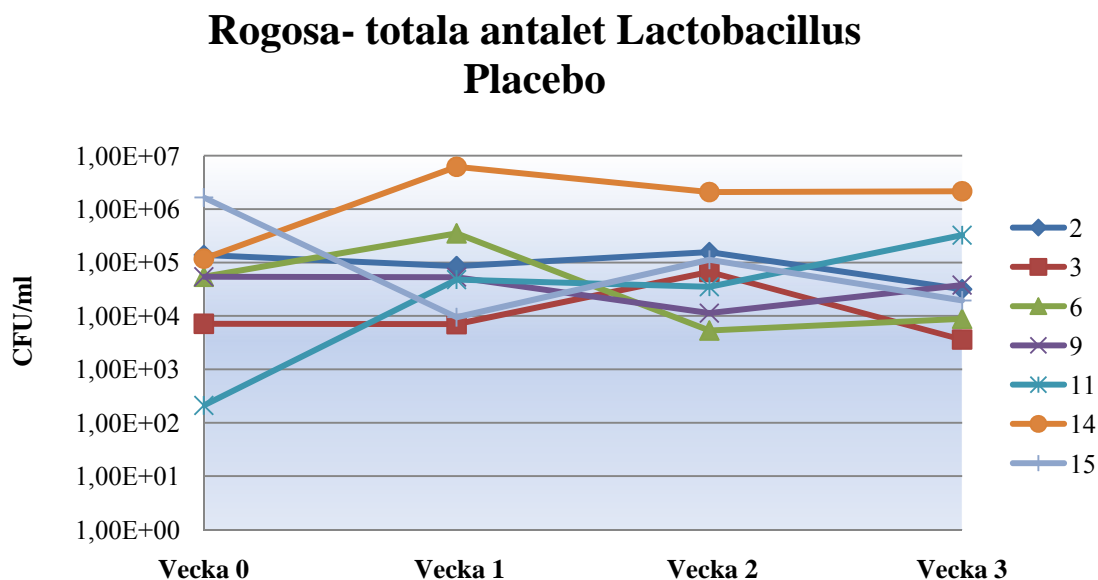
Figur 7. Kolonier av *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 på MRS med 0,5% griscgalla

## 12.2 Analys av laktobaciller

Graferna 7 och 8 visar probiotikagruppen och placebogruppen och jämförelse mellan dessa grafer visar att probiotikagruppen ger en spridd nivå av *Lactobacillus* medan placebogruppen har en mer stabil biota av *Lactobacillus*. Medelvärde räknades ut för de båda grupperna, probiotikagruppen hade  $4,01 \times 10^5$ , och placebogruppen var  $4,90 \times 10^5$ , detta var beräknat för hela studieperioden.



Figur 8. Totala antalet laktobaciller hos probiotikagruppen

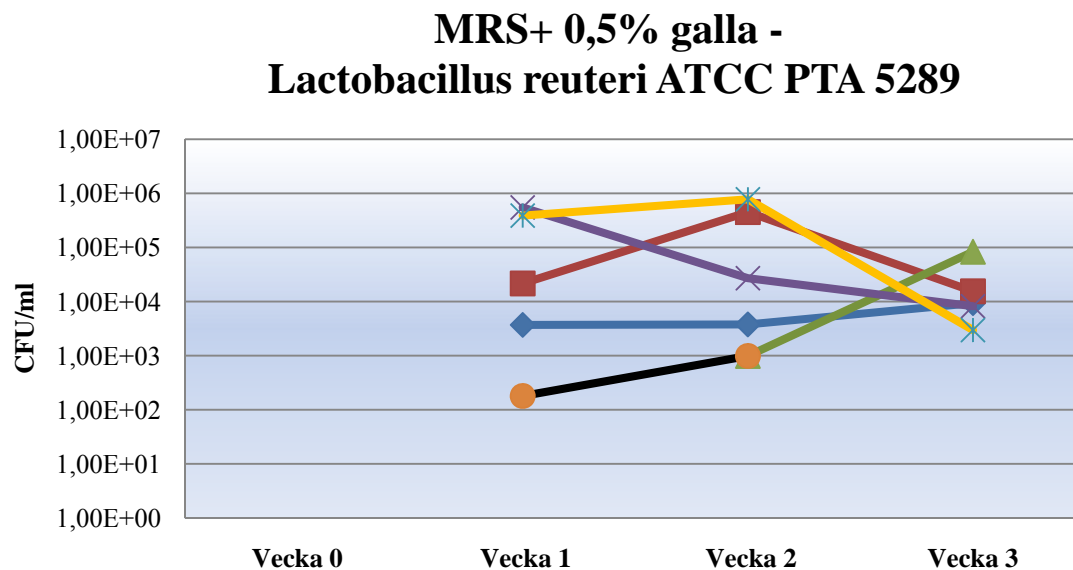


Figur 9 Totala antalet laktobaciller hos placebogruppen



### 12.2.1 Analys av *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289

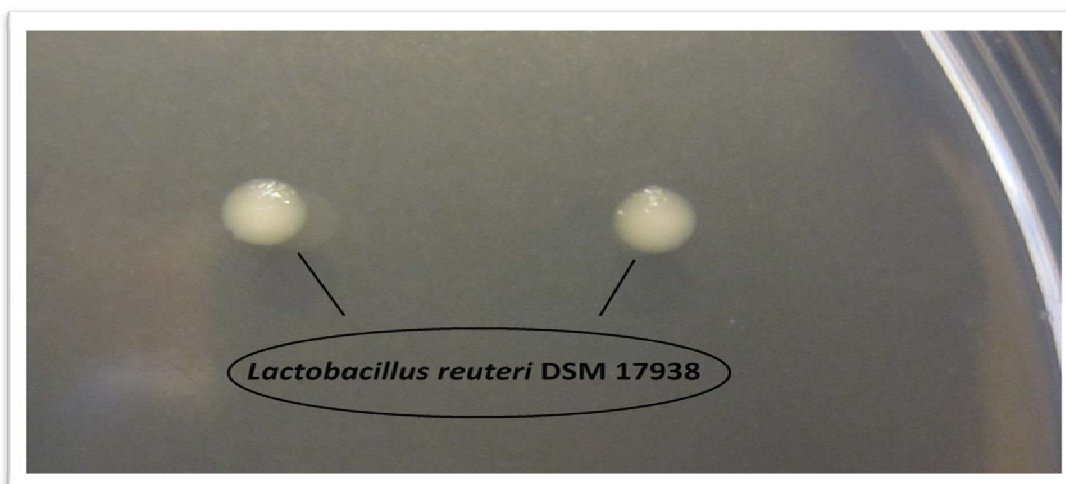
I grafen nedan kan ses att *L. reuteri* ATCC PTA 5289 fanns hos alla deltagare som fick probiotika utom person 16. Det som är intressant är att stammen stannar kvar en vecka efter att deltagarna slutat med probiotikan.



Figur 10. Mängden *Lactobacillus reuteri* ATCC 5289 hos probiotikagruppen

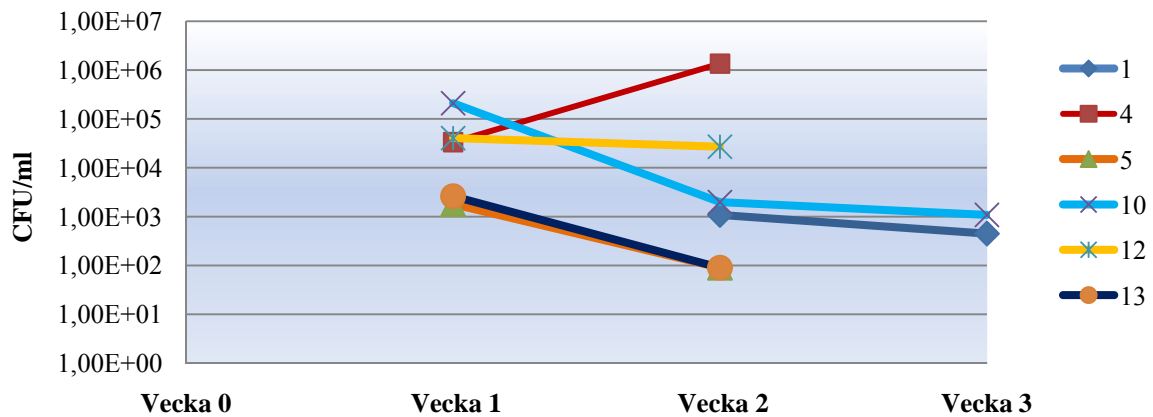
### 12.2.2 Analys av *L. reuteri* DSM 17938

Liksom för *L. reuteri* ATCC PTA 5289 finns *L. reuteri* DSM 17938 hos alla deltagare förutom hos person 16. Även här kan ses att den probiotiska stammen stannar kvar men bara hos två personer.



Figur 11. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 kolonier på Rogosa med ampicillin

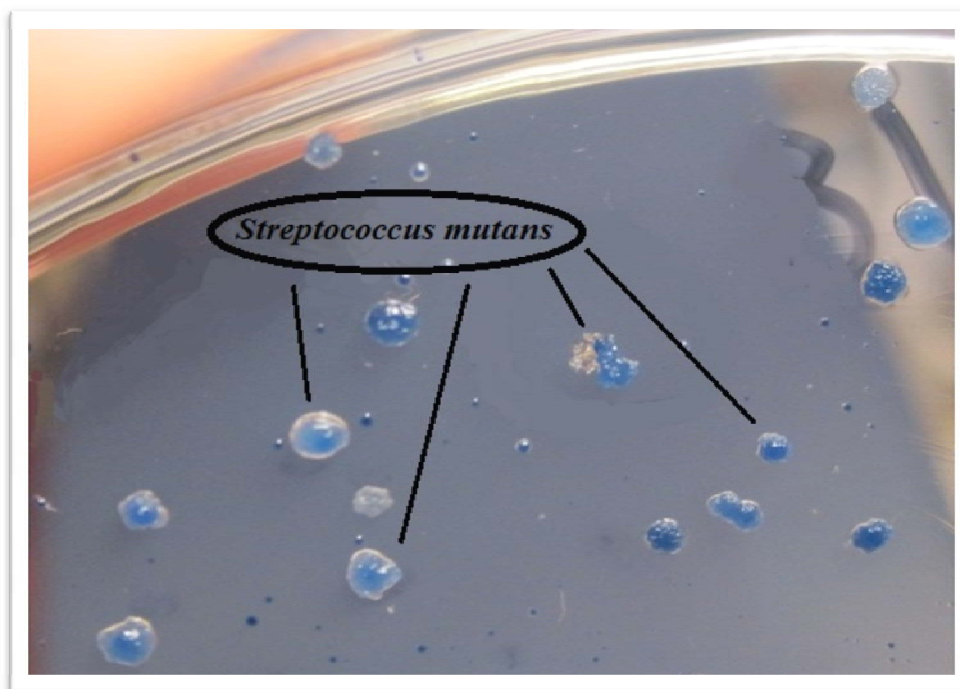
## Rogosa ampicilin- *Lactobacillus reuteri* DSM 17938



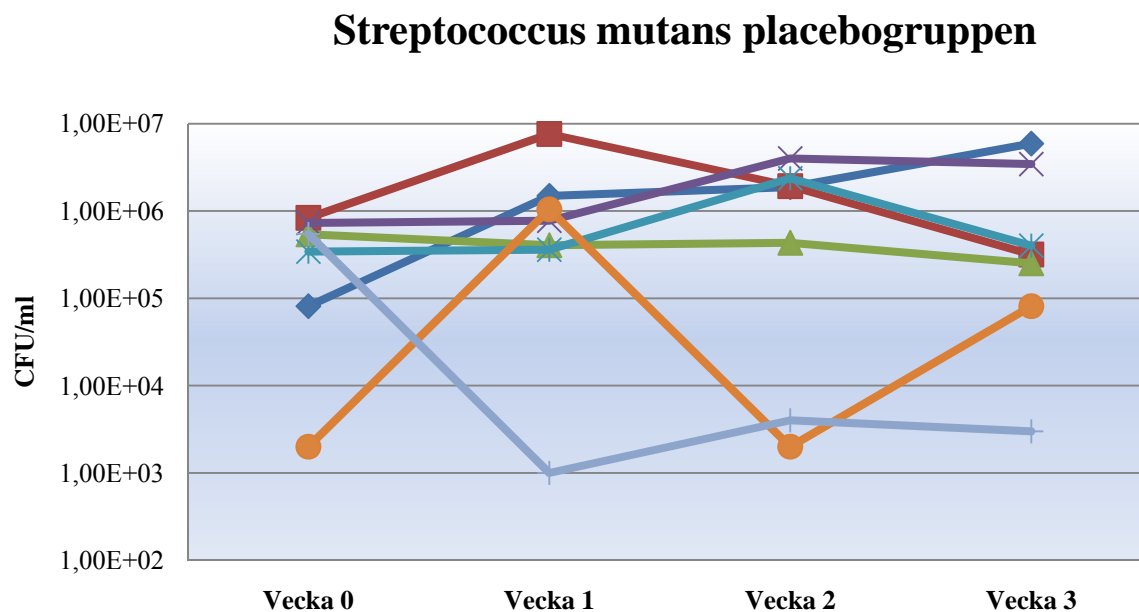
Figur 12. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 hos probiotikagruppen där två av deltagarna har kvar den probiotiska stammen efter vecka 2.

### 12.3 Analys av *S. mutans*

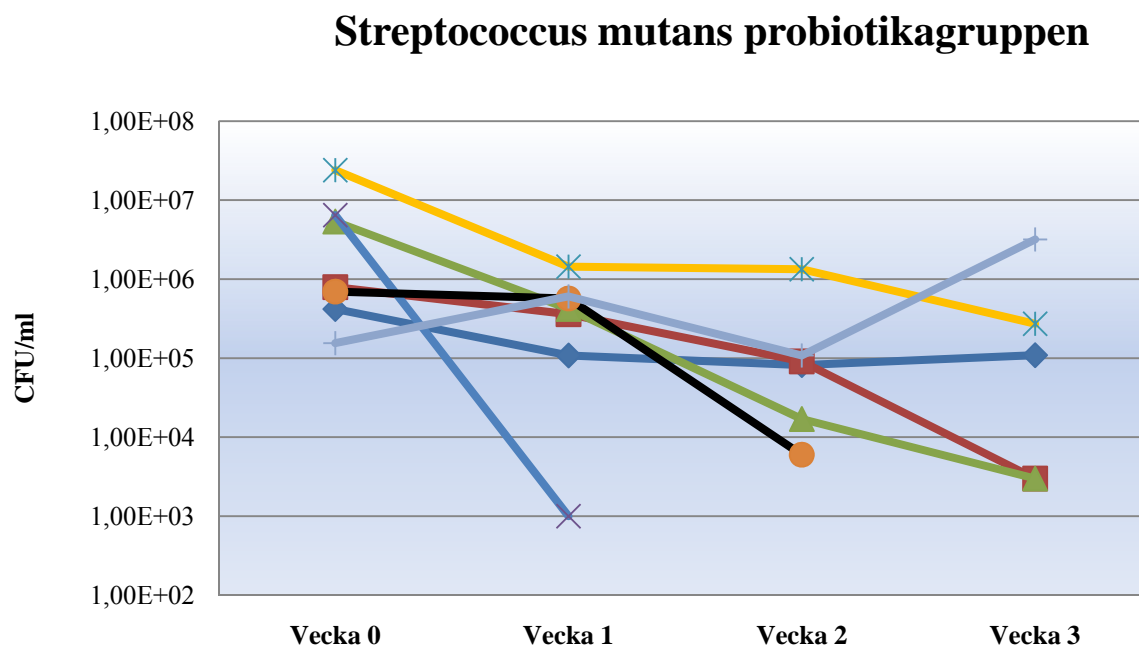
*S. mutans* varierande mycket mellan olika personer. I diagrammen nedan visas förändringen av *S. mutans*-nivån under studiens gång. Probiotikagruppen hade tydliga minskningar jämfört med placebo. Medelvärde på alla som hade ätit probiotika vid studiens start var  $5,41 \times 10^6$  jämfört med placebogruppen som hade  $3,42 \times 10^5$  under samma tid. Dock var medelvärdet vid studiens slut  $5,10 \times 10^5$  för probiotikagruppen och  $1,49 \times 10^6$  för placebogruppen. En signifikant skillnad fanns mellan probiotikagruppen vecka noll och vecka två,  $p = 0,02$ .



Figur 13. *S. mutans* kolonier, släta ljus eller lite mörkblå färg kännetecknar *S. mutans*



Figur 14. Antalet *Streptococcus mutans* hos placebogruppen (CFU/ml)



Figur 15. Antalet *Streptococcus mutans* hos probiotikagrupper (CFU/ml)

### 12.3.1 Konfirmering av *Streptococcus mutans*

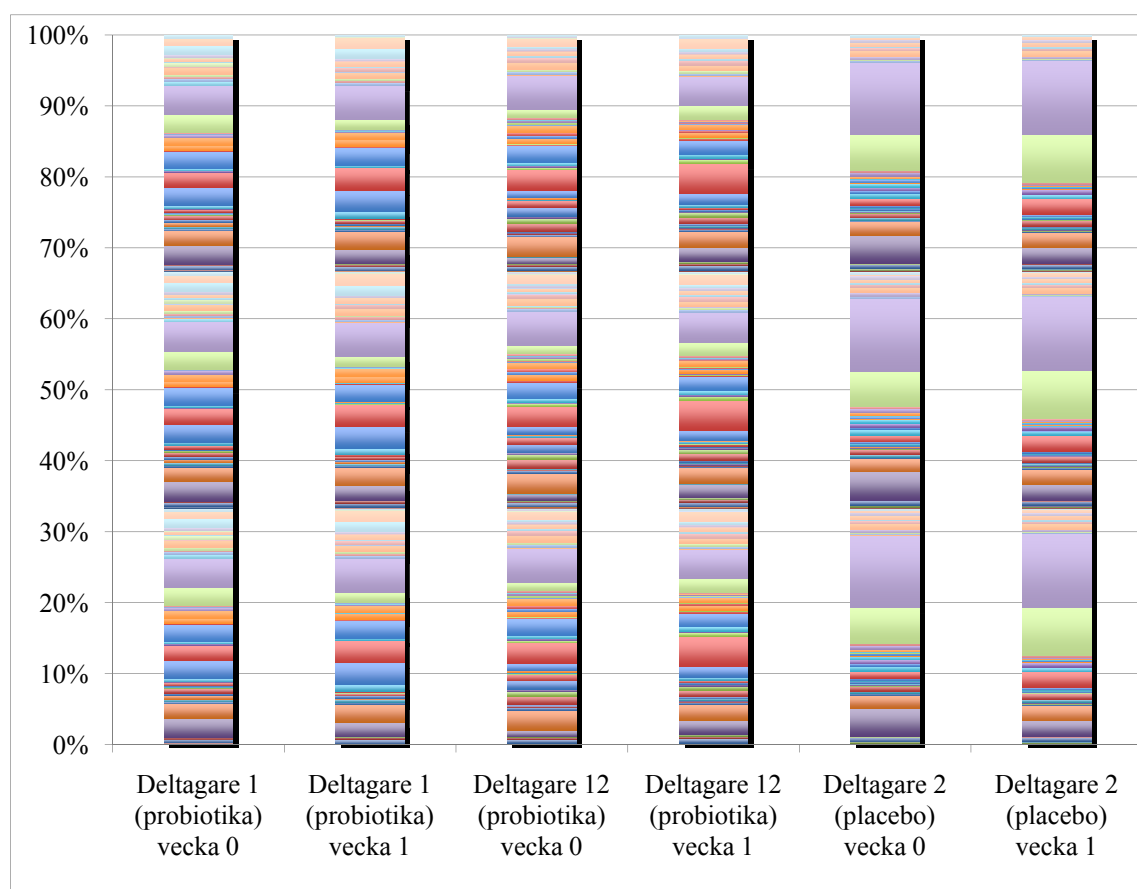
Vid konfirmeringen av *S. mutans* plattorna fanns även många andra bakterier. Dessa bakterier är liksom *S. mutans* tåliga mot K-tellurit, bacitracin och lågt pH, vilket gjorde att de växte bra. Efter konfirmeringen gjordes en uppföljning av *S. mutans* plattorna för att försäkra sig om att rätt kolonier hade räknats. Många av kolonierna såg nästan likadana ut till formen till skillnad från laktobacillernas kolonier. Det som särskiljde *S. mutans* från andra kolonier var att kolonierna var släta till ytan och hade antingen ljusblå eller lite mörkblå färg i.

**Tabell 4. Bakterier som fanns på *S. mutans* plattorna. *Streptococcus salivarius* och *Rothia dentocariosa* fanns också men ingen beskrivning finns.**

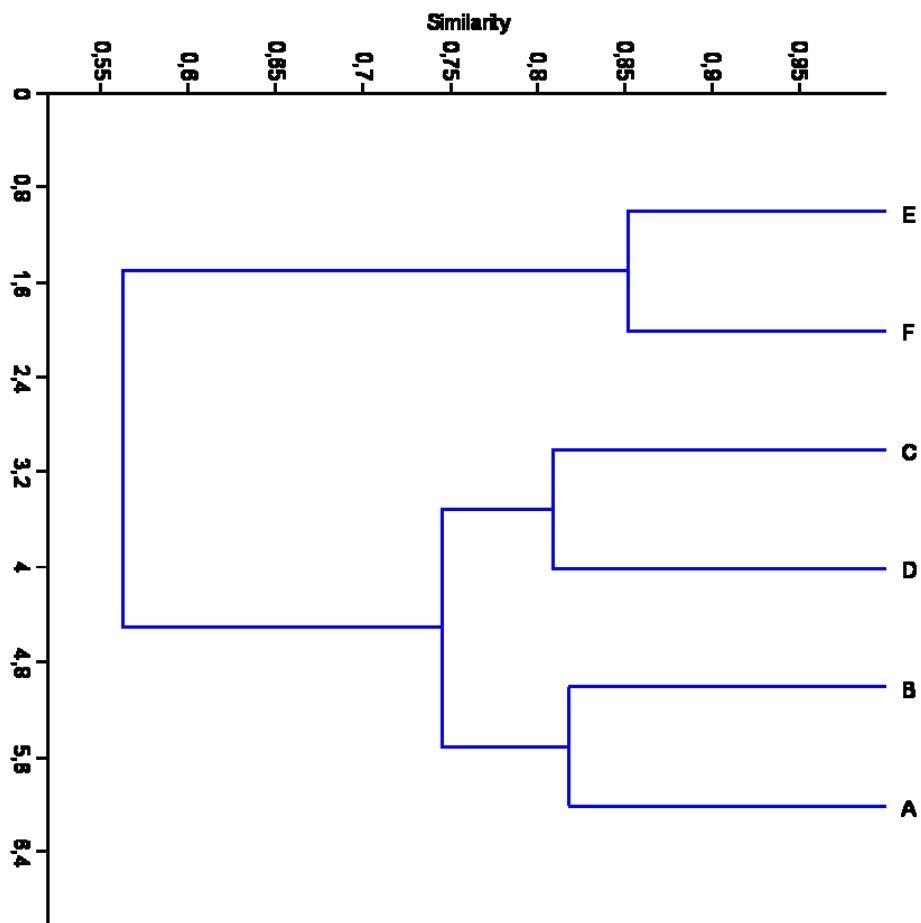
Bakterie	Koloniutseende
<i>Streptococcus mutans</i>	Blå mitt med oregelbundna former, geléaktiga med runda kanter Alt: små och helblå färg
<i>Veillonella dispar</i>	Små vita, kristall liknande med kantig form
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Stora runda med helblå färg
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stora runda med stigande svart färg mot mitten
<i>Streptococcus sobrinus</i>	Små, upphöjda, runda med blå mitt Alt: Runda med genomskinlig zon med grynig mitt.

## 12.4 T-RFLP

I diagrammet nedan visas resultatet från T-RFLP-analysen där varje stapel står för fördelningen av de olika bakterierna som finns i den orala mikrobiotan. Varje färg kan representera en eller flera bakterier. Det kan ses att den orala mikrobiotan är mycket stabil under de två veckor som proven tagits. Det finns också en stor likhet av vilka bakterier som finns hos de tre olika deltagarna och ca 50 procent av alla TRFer finns hos alla deltagare. Resultaten tyder också på att probiotikan inte påverkar de dominanta bakterierna men kan eventuellt påverka icke dominanta bakterier då dessa inte syns i T-RFLP analysen. TRF 317 och eventuellt 316 skulle motsvara *S. mutans*, dessa TRFer har inte förändrats nämnvärt, detta gäller även *L. reuteri*, TRF 63. Detta styrker bara mer att den orala mikrobiotan är stabil hos de tre deltagarna.



**Figur 16** Fördelning av de olika bakterierna i den orala mikrobiotan och hur den har förändrats från v.0 till v.1 hos tre av deltagarna. Färgerna i diagrammet kan motsvara en eller flera bakterier.



Figur 17. Resultatet från T-RFLP i form av ett klusterdiagram. Klusterdiagrammet visar hur lika proverna är jämfört med varandra. Där bokstäverna EF representerar deltagare två och motsvarar placebo. Bokstäverna CD och BA motsvarar probiotika och representerar deltagare ett respektive tolv.

### 13. Diskussion

I den orala mikrobiotan finns cirka 500 olika arter av bakterier. Dessa varierar mycket från person till person i både mängd och fördelning. Denna variation av den orala mikrobiotan kan jämföras med mag- och tarmkanalen som är ett större område men har ungefär lika många arter.

I och med att substratet för att odla *L. reuteri* ATCC PTA 5289 fungerade så pass bra möjliggör detta att substratet används i framtida studier. Innan MRS galla gjordes så testades även Rogosa med galla men resultatet blev inte lika bra som med MRS. Flera andra av bakterierna växte också och Rogosa med galla uteslöts då från studien.

*S. mutans* substratet som användes i studien gjorde att många andra bakterier kunde växa, detta trots att det fanns många tillsatser som till exempel höga halter av sackaros tillsammans med bacitracin och K-tellurit. pH värdet ställdes till 6.9 vilket kanske kunde varit lägre eftersom *mutans* bildar karies vid 5. Dock så testades ett annat substrat, TYS20B, med ungefär samma innehåll men utan kaliumtellurit, pepton, glukos,  $K_2HPO_4$  och trypan blått. Substratet fungerades inte alls lika bra som det i studien använda substratet gjorde. Men vid mycket sökande så kunde det konstateras att det inte verkar finnas något optimalt substrat för att odla *S. mutans*.

Effekten av probiotika på kariesbildande bakterier har varit god, av resultaten att döma sågs en tydlig minskning av *S. mutans* redan efter första veckan. Genom att jämföra *S. mutans* från de personer som ätit probiotika kan en tydlig minskning ses på *S. mutans*. Dock så hade person 16 en ökning av *S. mutans* men där fanns inte heller någon av de två *L. reuteri*-stammarna. Detta kan jämföras med personerna som fick placebo vilka har legat på en relativt stabil nivå av *S. mutans* under hela studien. Det som är intressant är att vissa av deltagarna hade kvar båda de probiotiska laktobacillerna efter att produkten slutat att ätas, medan andra hade bara *L. reuteri* ATCC PTA 5289 kvar. En av deltagarna hade till och med ökat nivån av stammen under vecka tre. Detta kan tyda på att stammen börjat kolonisera sig, om så är fallet skulle en fortsatt studie vara mycket intressant

Det finns många studier som visar att probiotika ger goda effekter. En av de stora utmaningarna som forskare ställs inför är att påvisa hur probiotika agerar mot andra bakterier. Det skulle kunna, i enkelhet, vara så att probiotikan ”trycker” eller dödar andra bakterier. När probiotika sluta konsumeras kommer fördelningen av bakterierna att återställas till nästintill normala även om de dominanta grupperna inte förändras nämnvärt. Från tidigare studier kunde även ses att en kombination av livsmedel kunde hämma probiotika (Caglar E et al, 2, 2007). Xylitol och probiotika fungerar bra separat mot *S. mutan* men tillsammans fungerar de inte lika bra. Detta bör vara i åtanke vid användning av de probiotiska sugrören (Caglar E et al, 3, 2007), skulle sugröret användas tillsammans med exempelvis läsk skulle det kunna ändra den probiotiska effekten. Beroende på hur probiotika tas så kan det ha olika stora effekter, tabletter som sugs ger bättre resultat med hänseende på *S. mutans* än tabletter som sväljs hela eller tuggas på. Därför skulle en mindre dos av probiotika kunna användas (Caglar E et al, 1, 2007), genom användande av exempelvis barnnappar. Samtliga studieprodukter som Çaglar E et al använde i sina studier har samma signifikans. Sugröret skiljer sig jämfört med de andra produkterna i den bemärkelsen att man suger i sig en dryck med probiotika. Med anledning av detta är det konstigt att signifikansen är lika.

I studien (Näse et al, 2001) där barn fick dricka mjölk med den probiotiska bakterien *Lactobacillus rhamnosus* GG kunde en minskning av karies ses. I studien (Nikawa et al, 2004) kunde en minskning av *S. mutans* ses genom att ge deltagarna i studien fermenterad komjölk som var preparerad med *L. reuteri*. Men sen finns det rapporterade artiklar där probiotika inte har haft någon större effekt. Olikt (Meurman et al, 1995) och (Nikawa et al, 2004) rapporterade (Montalto et al, 2004) en ökning av laktobaciller medan *S. mutans* var oförändrad när deras deltagare gavs probiotika i vätskeform eller i kapslar.

T-RFLP som gjordes var endast en pilot där tre personers saliv analyserades, för att det ska ge ett pålitligt resultat behöver fler prover köras. T-RFLP metoden är ett utmärkt sätt att se hur fördelningen i ett bakteriesamhälle ser ut, dock så har T-RFLP vissa svagheter då organismer ska identifieras utefter de data som uppkommer, detta eftersom kopplingen mellan TRFen och sekvensdata skiljer sig. Detta kan göras genom sekvensering av ett klonbibliotek. Profilen i diagrammet visade att fördelningen var stabil men påverkade vissa enskilda bakterier. Probiotikan har ingen stor effekt på de dominanta bakterierna men kan eventuellt påverka icke dominanta grupper såsom laktobaciller. De icke dominanta grupperna kan inte ses i T-RFLP analysen. TRF 317 och eventuellt 316 skulle motsvara *S. mutans*, dessa TRFer har inte förändrats nämnvärt, detta gäller även *L. reuteri*, TRF 63, som egentligen borde ha TRF 67. Detta styrker bara mer att den orala mikrobiotan är stabil hos de tre deltagarna.

I tidigare studier som har gjorts med analysmetoden T-RFLP har visats (Sakamota et al, 2004) att personer med kronisk eller aggressiv parodontit (inflammation i vävnaderna kring tandhalsarna) fått en minskad nivå av bakterierna *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* och *Treponema socranskii*. Patienterna behandlades enligt rutiner för parodontit, prover togs vid behandlingen och tre månader efter avslutad behandling. Dessa bakterier är dominanta vid parodontit och ger därför stora areor i TRFer, detta gör att bakteriernas ökning eller minskning kan följas under en viss tid. Det är endast möjligt att följa stora dominanta grupper av bakterier i T-RFLP.

Vid liknande studier i framtiden bör vissa tänkbara felkällor finnas i åtanke. Till exempel kan nämnas att deltagarna kunde fått en mer detaljerad beskrivning på vad de inte fick äta, att de skulle komma vid samma tider varje vecka när provet skulle tas. Att proverna tas vid ungefär samma tidpunkt kan påverka resultatet på så sätt att vid olika tidpunkter på dygnet finns olika mycket bakterier. Om tuggummi innehållande xylitol konsumeras skulle enligt tidigare studier (Çaglar E et al, 2010) detta påverka resultatet. Detta är förstås en övervägning på hur mycket krav som kan ställas på deltagare/patienter.



## 14. Slutsats

Avslutningsvis kan sägas att studien har fungerat bra och att använda plattor vid en sådan här studie för att odla *S. mutans* har inte gjorts förut då andra produkter har använts istället. Detta har gjort att studien har fått bättre kvantifiering av resultaten än vad tidigare studier har fått. Det gjordes även ett helt nytt substrat för odling av *L. reuteri* ATCC PTA 5289 som inte har funnits tidigare, detta möjliggör att substratet kommer att användas i framtida studier. Att *L. reuteri* har detekterats en vecka efter att studieprodukten var slut är ett resultat som aldrig visats tidigare, vilket skulle vara värt att studera vidare på.

## 15. Referenser

### 14.1 Litterära källor

Baron S, Medical microbiology Fourth Edition, The University of Texas Medical Branch at Galveston, USA 1996

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A5342> 2010-03-03
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A5343> 2010-03-04
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A5347> 2010-03-04

Caglar E

1. Kusch O.O, Cildir S.K, Kuvvetli S.S & Sandalli N, *A probiotic lozenge administrated medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli* Turkey 2007
2. Kavaloglu S. C, Kusu O. O, Sandalli N, Holgerson P. L. & Twetman S, *Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli* Turkey 2007; 11:425–429 2010-03-10
3. Cildir S.K, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S, *Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium Lactobacillus reuteri ATCC 55730 by straw or tablets* Turkey 2006; 64: 314-318 2010-03-10

Dicksved J, *Exploring the Human Intestinal Microbiome in Health and Disease* Uppsala, Sverige 2008, p.30-31

FAO/WHO, Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*, Argentina, 2001 2010-03-10

Hamada S, Slade D. H, Biology, *Immunology, and Cariogenicity of Streptococcus mutans* Colorado 1980, p. 331-384 Vol. 44, No. 2 2010-03-03

Meurman JH, Antila H, Korhonen A, et al. *Effect of Lactobacillus rhamnosus strain GG (ATCC 53103) on the growth of Streptococcus sobrinus in vitro*. Eur J Oral Sci. 1995;103:253-8

Montalto M, Vastola M, Marigo L, et al. *Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized controlled study*. Digestion. 2004;69:317-20

Nakano Y, Takeshita T, Kamio N, Shiota S, Shibata Y, Yasui M, Yamashita Y, *Development and application of T-RFLP data analysis method using correlation coefficient matrices*, Japan 2008

Nikawa H, Makihiro S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida I, et al, *Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci*. International Journal of Food Microbiology 2004;95:219-23

R. Spiller, Wolfson Digestive Diseases Centre, *Probiotics and Prebiotics in IBS: Mode of Action of Probiotics*, University of Nottingham, Nottinghamshire, Storbritannien 2008

Sakamota M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I and Benno Y, *Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes*, Journal of Medical Microbiology 2004, 53, 563-571

Schrezeimer J, de Vrese M, *Probiotics, rebiotics, and synbiotics-approaching a definition*<sup>1-3</sup>, The American Journal of Clinical Nutrition, 2001;73(suppl):361S-4S, American Society for Clinical Nutrition USA 2001 2010-03-10

Suddick R.P, Harris O.N, *Historical Perspectives of Oral Biology: A Series Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1990; 1 2010-03-2

## 15.2 Internetkällor

*Abouts hemsida*

[http://inventors.about.com/od/dstartinventions/a/dentistry\\_2.htm](http://inventors.about.com/od/dstartinventions/a/dentistry_2.htm) 2010-03-02

*ADA, American Dental Associations hemsida*

[http://www.ada.org/public/resources/history/timeline\\_ancient.asp](http://www.ada.org/public/resources/history/timeline_ancient.asp) 2010-03-01

*Allt om dina tänder hemsida*

<http://www.alltomdinaander.se/Kul--kuriosa/Fluortanten/> 2010-03-03

*Applied Biosystems hemsida*

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=603624> 2010-03-09

*Colgate World of Cares hemsida*

<http://www.colgate.com/app/Colgate/US/OC/Information/OralHealthBasics/GoodOralHygiene/BrushingandFlossing/HistoryToothbrushesToothpastes.cvsp> 2010-03-02

*EB, Encyclopedia Britannica hemsida*

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/27751/antibiotic> 2010-03-12

*Egyptology online hemsida*

[http://www.egyptologyonline.com/the\\_dentist.htm](http://www.egyptologyonline.com/the_dentist.htm) 2010-03-01

*Maria Tandvårds hemsida*

<http://www.mariatand.se/sida.asp?sida=redigera&under=true&sidid=372&hsidid=323&understeg=2> 2010-03-04

*University of Oslo hemsida*

<http://folk.uio.no/ohammer/past/> 2010-03-09

*1177 Råd om Vård på Web och Telefon*

<http://www.1177.se/allakapitel.asp?CategoryID=37103> 2010-03-03

Rondini E, hemsida

<http://web4.cs.ucl.ac.uk/staff/E.Rondini/wordpress/wpcontent/uploads/2006/09/toothsection.jpg> 2010-03-12

School of Dental Sciences hemsida

<http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/images/streps.gif> 2010-03-12

University of Leeds

<http://www.dentistry.leeds.ac.uk/OROFACE/PAGES/micro/path1.gif> 2010-03-12

### **15.3 Personliga meddelanden**

Härse Bengt, Orion Diagnostica, Affärsutvecklare/Produktchef Laboratoriemedicin, telefonkontakt 2009-09-12

Roos Stefan. SLU institutionen för mikrobiologi, Forskare, regelbunden kontakt

## 16. Bilagor

### 16.1 Primers

16ss primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-3')

16sr primer (5'-CGGGAACGTATTCACCG-3')

(HaeIII i detta fall) (5'...GG/CC...3' och 3'...CC/GG...5')

### 16.2 Substratrecept

<b><u>Mutans 1liter</u></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Tryptos</li><li>• Pepton</li><li>• Glukos</li><li>• Sackaros</li><li>• K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g</li><li>• Trypan blått 12g</li><li>• K-tellurit 1% 1ml</li><li>• Technical agar 15g</li><li>• Bacitracin 200U 1ml</li></ul> <p>Ställ pH till 6,9</p> <p>Autoklavering 125°C i 15</p>	<b><u>Rogosa Ampicilin 1liter</u></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Rogosa 74,5g</li><li>• Ampicilin 1ml</li><li>• Isättika 1,3ml</li></ul> <p>Ställ pH till 5,5</p> <p>Mikrovågsugn tills det har löst sig</p>
	<b><u>MRS med 0,5% galla 1liter</u></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• MRS agar 62g</li><li>• Grisgalla 5g</li></ul> <p>Autoklavering 125°C i 15 min</p>

### 16.3 Formler och statistik

$$\text{CFU/ml} = (n1 + n2 + n3 \dots) \sum (V1 + V2 + V2 \dots)$$

T-Test: två sidor med samma varians

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1 X_2} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}}$$